

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
27 septembre 2001 (27.09.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/70400 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : **B01L 3/00**
// B01J 19/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/00881

(22) Date de dépôt international : 22 mars 2001 (22.03.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/03680 22 mars 2000 (22.03.2000) FR

(71) Déposant et

(72) Inventeur : **GELI, François** [FR/FR]; 119, boulevard
Yves Farge, F-69007 Lyon (FR).

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

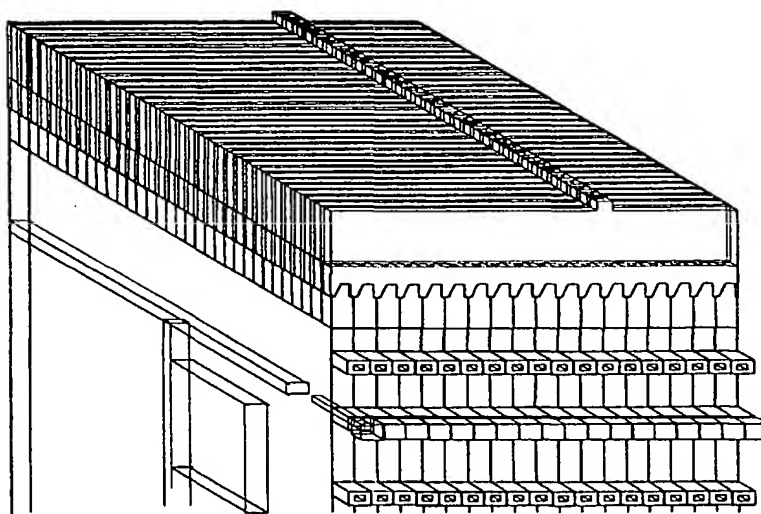
Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: MULTIBLOCK MICRO-ARRAYS OR MACRO-ARRAYS WITH LAB-ON-A-CHIP

(54) Titre : MICRO-ARRAYS OU MACRO-ARRAYS MULTIBLOCS AVEC LABORATOIRES SUR PUCES INTEGRES



(57) Abstract: The invention concerns multiblock micro-arrays or macro-arrays incorporating laboratories on chips, for use in chemical, biochemical or biological analysis or chemical or biochemical synthesis. It consists in a flat elementary module provided with parallel microchannels at their surface which emerge into the thickness and on the edge of their sides. The stacking of several similar flat elementary modules creates a sealed superimposition of lines of the micro-array or macro-array, and consequently an integral multiblock micro-array or macro-array. The microchannels can be provided with micro-mixers and widened portions, provided with molecule-fixing surfaces or receive micro-columns or micro-particles or micro-spheres, thereby enabling to perform on very small volumes parallel reactions, by juxtaposing the lines. Multiblock micro-arrays or macro-arrays can constitute an integrated chain of analysis or synthesis.

[Suite sur la page suivante]

WO 01/70400 A1



En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(57) Abrégé : L'invention concerne des micro-arrays ou macro-arrays multiblocs intégrant des laboratoires sur puces, utilisables en Analyse Chimique, Biochimique ou Biologique ou en Synthèse Chimique ou Biochimique. L'invention est un module élémentaire plat pourvu de microcanaux parallèles à leur surface qui débouchent dans l'épaisseur et sur la tranche d'un de leurs côtés. L'empilement de plusieurs modules élémentaires plats analogues crée une superposition de lignes du micro-array ou macro-array de manière étanche, et par conséquent un micro-array ou macro-array multibloc tout entier. Les microcanaux peuvent être pourvus de micromélanges et de portions élargies, dotées de surfaces de fixation de molécules ou accueillent des microlonnes ou des micro-particules ou des microsphères, ce qui permet d'effectuer sur de très petits volumes les réactions en parallèle, par la juxtaposition de lignes. Des micro-arrays ou macro-arrays multiblocs peuvent constituer toute chaîne intégrée d'analyse ou de synthèse.

Micro-arrays ou macro-arrays multiblocs avec laboratoires sur puces intégrés

La présente invention concerne des macro-arrays multiblocs ou micro-arrays multi-blocs en trois dimensions intégrés dans une chaîne prête à l'emploi continue ultra compacte de

5 synthèse ou d'analyse chimique, biochimique ou biologique. Ces micro-arrays ou macro-arrays multi-blocs intègrent des Lab-on-a-Chip (laboratoires sur puces).

L'analyse biologique ainsi que l'analyse et la synthèse chimique et biochimique utilisent de plus en plus des "micro-arrays" ou des "macro-arrays", le terme anglais «array» désignant en analyse chimique un quadrillage plan dense ou très dense d'objets identiques, généralement
10 des puits ou des micro-emplacements pour dépôts ou synthèse (voir Figure 1C). Les densités courantes des macro-arrays sont de l'ordre de 10 à 100 micro-emplacements au cm², les densités courantes des micro-arrays sont de l'ordre de 100 à 1000 micro-emplacements au cm². Dans ces puits ou sur ces micro-emplacements sont déposées ou synthétisées de petites quantités de molécules chimiques, de peptides, d'acides nucléiques ou d'autres molécules
15 biologiques ou organiques. Les macro-arrays et les micro-arrays sont utilisés pour la recherche de nouveaux matériaux, pour le screening de nouveaux polymères synthétiques, pour la découverte de nouveaux médicaments, pour l'analyse de peptides et de protéines, pour l'étude des interactions protéiques, pour des programmes de Biologie Moléculaire tels qu'études de maladies génétiques, Génomique (cartographie des génomes par marqueurs
20 moléculaires, étude des polymorphismes génétiques), de Génomique Fonctionnelle (expressions de gènes différentielles spécifiques de processus physio-pathologiques, d'organes ou de ou de tissus affectés par des maladies, recherche de nouvelles cibles thérapeutiques), de Pharmacogénomique (réponse individuelle aux médicaments, recherche du mode d'action de médicaments).

25 Le terme anglais Lab-on-a-Chip, laboratoire sur puce, désigne des supports miniaturisés d'analyse, fabriqués avec des techniques de micro-fabrication issues de la micro-électronique, où les fluides sont convoyés dans des micro-canaux, classiquement de 10 à 500 microns de diamètre. Leur intérêt réside dans l'économie de réactifs, la simplification et l'amélioration des procédés d'analyse et de synthèse, l'augmentation de la vitesse réactionnelle, la
30 préservation des contaminations, l'augmentation du nombre d'analyses ou de synthèse par unité de volume et par unité de temps, la baisse des coûts, la portabilité des supports d'analyse, etc.

La présente invention apporte le moyen d'intégrer des Lab-on-a-chip aux macro-arrays ou aux micro-arrays en assurant des connexions sans rupture dans la chaîne d'analyse, ce qui
35 n'était pas le cas auparavant, puisque dans les procédés antérieurs il fallait envisager une phase d'exposition à l'air libre (telle que par exemple un pipetage) pour passer des Lab-on-chips aux macro-arrays ou micro-arrays, ou des macro-arrays ou micro-arrays aux Lab-on-chips.

En effet, la configuration multiblocs de macro-arrays et de micro-arrays de l'invention bénéficie d'une architecture compacte des connexions fluidiques entre diverses parties du système d'analyse ou de process microfluidique et permet de manipuler de très petites quantités de fluides avec des connexions étanches à l'évaporation et aux contaminations.

L'invention décrit aussi les techniques de micro-fabrication utilisées pour fabriquer le système de connexions fluidiques de ces macro-arrays ou microarrays.

A titre d'exemple, il est fait une description d'une application dans le domaine de l'analyse d'acides nucléiques en Biologie Moléculaire qui permet l'analyse et la synthèse d'acides nucléiques sur des macro-arrays ou des micro-arrays multiblocs de l'invention intégrant des laboratoires d'analyse sur puces (Lab-on-a-Chip) assurant au moins la préparation des échantillons et des réactifs.

Il est montré le type de configuration générale du systèmes d'analyse ou de synthèse intégré et miniaturisé que permet l'invention.

L'architecture et la conception de fabrication des différents modules qui composent ces micro-arrays ou macro-arrays sont déclinés selon les critères d'analyse demandés et les différentes options retenues dans le mode de préparation des réactifs et dans le mode de détection .

L'exemple retenu en matière d'analyses d'acides nucléiques n'est qu'une illustration de ce qui peut être réalisé selon l'invention dans des domaines aussi divers que par exemple la chimie de synthèse combinatoire, l'analyse chimique combinatoire, les immuno-analyses, bref tout type d'analyse biologique ou biochimique ou chimique où l'on doit assurer de très importants de programmes de recherche et d'analyse, chaque opération élémentaire devant utiliser le moins possible d'échantillons et de réactifs et devant durer le moins de temps possible.

Etat Actuel de l'Art dans les micro-arrays ou macro-arrays en Analyse Chimique, Biochimique ou Biologique:

5

On peut se reporter à un certain nombre de références pour l'utilisation des micro-arrays ou macro-arrays en analyse et en synthèse chimique et biochimique, et en analyse biologique:

- 10 * pour la recherche de nouveaux matériaux (Xiang XD, Sun X, Briceno G, Lou Y, Wang KA, Chang H, Wallace-Freedman WD, Chen SW, Schultz PG. A combinatorial approach to material discovery. Science 1994, 268, 1738.)
- * pour l'analyse de molécules organiques. (Braun RM, Beyder A, Xu J, Wood MC, Ewing AG, Winograd N. Spatially resolved detection of attomole quantities of organic molecules localized in picoliter vials using Time-of-Flight secondary ion mass spectrometry.
- 15 Anal.Chem., 1999, 71, 3318-3324).
- * pour le screening de nouveaux polymères synthétiques (Reynolds CH. Designing diverse and focused combinatorial libraries of synthetic polymers. Journal of Combinatorial Chemistry, 1999, 1, 297-306).
- * pour la découverte de nouveaux médicaments (Hogan J. Combinatorial Chemistry in Drug
- 20 Discovery. Nature Biotechnology. 1997, 15, 4.)
- * pour l'analyse de peptides et de protéines (Dawies H, Lomas L, Austen B. Profiling of Amyloid beta peptide variants using SELDI ProteinChip arrays.. Biotechniques. 1999, 27, 1258-1261. _ Kaur S, Mc Guire L, Tang D, Dollinger G, Huebner V. Affinity selection and mass-spectrometry-based strategies to identify lead compounds in combinatorial libraries.
- 25 Journal of Protein Chemistry, 1997, Vol 16, N°5, 505-511. _ Tartar A, La chimie combinatoire. Biofutur, 1997, 168, 26-31 _ Michelet D, Hélène C. La synthèse combinatoire. Pour la science. 1997. 241. 50-54
- * pour l'étude des interactions protéiques (Colas P. Micro-arrays pour l'étude des interactions protéiques à l'échelle génomique. Médecine Sciences. 2000, 506, 50- 55.)
- 30 * pour des programmes de Biologie Moléculaire tels qu'études de maladies génétiques, de génomique (cartographie des génomes par marqueurs moléculaires, étude des polymorphismes génétiques), de génomique fonctionnelle (expressions différentielles spécifiques d'organes ou de processus physiopathologiques ou de tissus affectés par des maladies, recherche de nouvelles cibles thérapeutiques), de pharmacogénomique (réponse
- 35 individuelle aux médicaments, recherche du mode d'action de médicaments), etc. (Southern E.M., Case-Green S.C., Elder J.K., Johnson M., Mir K.U., Wang L., Williams J.C. Arrays of complementary oligonucleotides for analysing the hybridization behaviour of nucleic acids. Nucleic Acids Research, 1994, Vol 22, No8, 1368-1373. _ Maskos U., Southern E.M. A study of oligonucleotide reassociation using large arrays of oligonucleotides synthesised on a

- glass support. *Nucleic Acids Research*, 1993, Vol21, No20, 4663-4669. _ Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. _ Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, 270, 467-470. _ Yang GP, Ross DT, Kuang WW, Brown PO, Weigel RJ.. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid
- 5 identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27, 6, 1517-1523. _ Lashkari D.A., McCusker J.H., Davis R.W. Whole genome analysis: experimental access to all genome sequenced segments through larger-scale efficient oligonucleotide synthesis and PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997, 94, 8945-8947. _ Livache T., Fouque B., Roget A., Marchand J., Bidan G., Téoule R., Mathis G. Polypyrrole DNA chip on a
- 10 silicon device: example of Hepatitis C virus genotyping. *Analytical Biochemistry*, 1998, 255, 188-194. _ Guo Z., Guilfoyle R.A., Thiel A.J., Wang R., Smith L.M. Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucleic Acids Research*, 1994, Vol.22, No24, 5456-5465. _ O'Donnell-Maloney M.J., Smith C.L., Cantor C.R.. The development of microfabricated arrays for DNA
- 15 sequencing and analysis. *TIBTECH*, 1996, 14, 69-73. _ Little D.P., Braun A., O'Donnell M.J., Köster H.. Mass spectrometry from miniaturized arrays for full comparative DNA analysis. *Nat. Med.*, 1996, 13, No12, 1413-16. _ Little D.P., Cornish T.J., O'Donnell M.J., Braun A., Cotter R.J., Köster H. _ MALDI on a chip: analysis of arrays of low-femtomole to subfemtomole quantities of synthetic oligonucleotides and DNA diagnostic products
- 20 dispensed by a piezo-electric pipet. *Anal. Chem.* 1997, 69, 4540-46. _ Hacia J.G., Edgemon K., Sun B., Stern D., Fodor S.P.A., Collins FS. Two color hybridization analysis using high density oligonucleotide arrays and energy transfer dyes. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26, 16, 3865-3866 _ Weiler J, Hoheisel JD. Combining the preparation of oligonucleotide arrays and synthesis of high-quality primers. *Analytical Chemistry*, 1996, 243, 218-227 _ Cheng J,
- 25 Sheldon EL, Wu L, Uribe A, Gerrue LO, Carrino J, Heller MJ, O'Connell JP. Preparation and hybridization analysis of DNA/RNA from E.Coli on microfabricated bioelectronic chips. *Nature Biotechnology*. 1998, 16, 541-546. _ Mirzabekov et al.. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. *PNAS*, 1996, 93, pp4913-4918 _ Mirzabekov et al. Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in
- 30 microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63, 6, 2397-2402 - Mirzabekov et al. DNA sequence analysis by hybridization with oligonucleotide microchips: MALDI mass spectrometry identification of 5-mers contiguously stacked to microchip oligonucleotides. *Nucleic Acids research*, 2000, 28, 5, 1193-1198 _ Rehman FN, Audeh M, Abrams ES, Hammond PW, Kenney M, Boles TC. Immobilization of acrylamide-modified
- 35 oligonucleotides by co-polymerization. *Nucleic Acids research*, 1999, 27, 2, 649-655).

Le dépôt des molécules sur les micro-arrays ou macro-arrays s'effectue grâce à des micro-arrays (Tisone TC. Dispensing system for miniaturized diagnostics. *IVD Technology*, 1998, 4:40. _ Lemmo AV. Quantitative nanoliter dispensing. *Genet Eng News*, 1998, 14:30.

_ Oldenburg KR, Zhang J, Chen T, Maffia A, Blom KF, Combs AP, Chung TDY. Assay miniaturization for ultra high throughput screening of combinatorial and discrete compound libraries: a 9600 well (0.2 microliter) assay system. *J. Biomol Screening*, 1998, 3, 55-62. _ Papen R., Croker K, Kolb A. Nanoliter dispensing technology. *Genet. Eng. News*. 1998, 9:16-17. Lemmo AV, Rose DJ, Tisdone T. Inkjet dispensing technology: applications in Drug Discovery. *Current Opinion in Biotechnology*. 1998, 9, 615-617. _ Graves DJ, Su HJ, McKenzie SE, Surrey S, Fortina P. System for preparing microhybridization arrays on glass slides. *Anal. Chem*, 1998, 5085-5092 _ McBride SE, Moroney RM, Chiang W. Electrohydrodynamic pumps for high density microfluidic arrays. *μ-TAS 1998*, Canada, pp45-50.)

Des développements existent aujourd'hui pour fabriquer des micro-aiguilles (Lebouitz KS, Pisano AP, Microneedles and microlancets fabricated using SOI wafers and isotropic etching. *Electrochemical Society Proceedings*, vol 98-14, 237-242) et des multipipettes miniaturisées (Papautsky I, Brazzle JD, Weiss RB, Ameel TA, Frazier AB. Parallel sample manipulation using micromachined pipette arrays. *SPIE Proceedings 1998*, Vol. 3515-09, 104-114. _ Brazzle JD, Papautsky I, Frazier AB. Fluid-coupled hollow metallic micromachined needle arrays. *SPIE Proceedings 1998*, 3515-13, pp116-124 _ Frazier AB, Methods for preparing devices having metallic hollow microchannels on planar substrate surfaces. US Patent 5876582 _ Szita N, Buser R. A pneumatically actuated micropipetting device. *SPIE 3258*. 156 - 160.).

Ces développements sont illustrés par la Figure 1C où un dispositif multipipette (1776) dispense les réactifs sur un micro-array (1777).

Tels qu'ils sont conçus aujourd'hui, les micro-arrays font subir aux analytes une exposition à l'air libre, où des problèmes d'évaporation et de contamination sont à craindre.

Chaque puits du micro-array ou macro-array peut être adressé individuellement par des électrodes pour diriger un champ électrique, comme les micro-arrays du CEA-LETI ou de la société Nanogen (Westin L, Xu X, Miller C, Wang L, Edman CF, Nerenberg M. Anchored multiplex amplification on a micro-electronic chip array. *Nature Biotechnology*, 2000, 18, 199-204), ou bien des capteurs, comme par exemple dans le brevet "Microelectrochemical sensor and sensor array. US Patent 4874500". Chaque puits du micro-array ou macro-array peut aussi être adressé individuellement par des fibres optiques (Healey BG, Matson RS, Walt DR, Fiber optic DNA sensor array capable of detecting point mutations, *Anal. Biochem.*, 1997, 251, 270-279).

En Analyse Biologique, les micro-arrays où sont faits des dépôts de sondes peuvent être en concurrence avec des puces de synthèse in situ par utilisation de groupements photolabiles (Fodor S.P. Accessing genetic information with high-density DNA arrays. Science, 1996, 274, 610-613 _ Jacobs J.W., Fodor S.P.A. Combinatorial chemistry applications of light-directed chemical synthesis. TIBTECH, 1994, 12, 19-26. Lipshutz R.J., Morris D., Chee M., Hubbell E., Kozal M.J., Shah N., Shen N., Yang R., Fodor S.P.A. Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. Biotechniques, 1995, 19, No3, 442-447. _ Singh-Gasson S; Green RD, Yue Y, Nelson C, Blattner F, Sussman MR, Cerrina F. Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide micro-arrays using a digital micromirror array. Nature Biotechnology. 1999, 17, 974-978). C'est sur la synthèse par groupements photolabiles que repose en partie les systèmes d'Affymetrix pour la Biologie Moléculaire et ceux d'Affymax pour l'étude d'affinité de peptides (Brevet International WO9210092A1 d'Affymax Technologies). Il s'effectue alors un changement d'échelle dans la densité d'intégration (jusqu'à 400 000 sondes au cm²), mais par contre ces systèmes sont dédiés à l'analyse exhaustive d'un seul échantillon. Des procédés sont envisagés pour les intégrer dans une chaîne de préparation et d'analyse, où un seul échantillon est totalement pris en charge dans une micro-circuiterie fermée (Anderson R.C., Lipshutz R. J., Rava R.P., Fodor S.P. Integrated nucleic acid diagnostic device. US Patent WO 97/02357). Parallèlement à cela, afin de parer au fait que ces dispositifs de synthèse in situ sont dédiés à l'analyse exhaustive d'un seul échantillon, il est envisagé de fabriquer des micro-arrays ou macro-arrays de puces (Affymax Technologies. Bioarray chip reaction apparatus and its manufacture. WO 9533846 _ Methods for concurrently processing multiple biological chip assays. Affymetrix. US Patent 5874219 _ Affymax Technologies. Very large scale immobilized polymer synthesis, WO9210092).

25

Avantages de la miniaturisation et des systèmes micro-fluidiques:

De nombreux laboratoires essaient d'ajuster la consommation de réactifs au minimum permis par la sensibilité du système d'analyse. Le but est l'économie en réactifs, cruciale lorsque certains d'entre eux sont particulièrement chers. La miniaturisation est une piste particulièrement intéressante à suivre, dès lors que se présentent les premiers réactifs onéreux dans une chaîne d'analyse.

Par exemple, en matière d'analyse d'acides nucléiques, le premier réactif rencontré très onéreux est l'ADN polymérase utilisée dans diverses méthodes d'Amplification d'un fragment d'acides nucléiques. Dans cet exemple, les phases préliminaires à l'Amplification (Prélèvement, Lyse cellulaire, Extraction, Concentration, Purification) peuvent sans grande conséquence économique rester à une macro-échelle. Par contre, le coût de l'ADN Polymérase fait qu'il est intéressant de passer à une micro-échelle dès cette étape

35

d'amplification. La conséquence d'une telle option est que les phases qui suivent (détection) doivent elles aussi se passer à une micro-échelle. Lesdites phases de détection possèdent par ailleurs un niveau limite de sensibilité et peuvent par conséquent indiquer le niveau limite de miniaturisation et se situer en facteur limitant de la réduction de taille.

5

Les impératifs de qualité exigent une minimisation des faux-positifs et des faux-négatifs. Aux causes internes (bruits de fond dûs aux limites de l'instrumentation et aux défauts de purification, réactions croisées avec des analytes normalement présents dans l'échantillon) peuvent s'ajouter en effet des causes externes, généralement des contaminations des échantillons par les molécules présentes dans l'environnement.

10

Des circuits d'analyse étanches doivent permettre de s'affranchir de ce risque externe, généralement en réduisant le plus possible des opérations de pipetage.

15

Dès le moment où les volumes d'analyses sont très réduits, la manipulation des échantillons et des analytes peut se faire sur des supports haute densité qui non seulement bénéficient d'une cinétique de réaction grandement améliorée par les faibles volumes mis en jeu, mais permettent de réduire le nombre et la longueur de déplacements des organes des robots de manipulation des échantillons et des réactifs, ce qui améliore les temps demandés pour ces opérations. De plus ces hautes densités favorisent les architectures massivement parallèles, ce qui permet de réduire considérablement le temps total d'analyses d'un lot d'échantillons. Enfin, la réduction de taille permet d'envisager plusieurs étapes de l'analyse sur le même consommable, facilitant et réduisant les manipulations et menant au concept de consommables « intégrés », dont l'utilisation permet là-aussi d'accélérer l'analyse.

20

25

Les hautes cadences d'analyse doivent être recherchées en minimisant les investissements de robotisation. Là aussi, la piste suivie est la miniaturisation des appareils qui pourrait autoriser leur fabrication à moindre coût. En effet, ces appareils miniaturisés utilisent moins de matière première, ont moins de pièces, utilisent des composants meilleur marché, demandent moins de place, et ont pour ambition de rassembler plusieurs fonctions.

30

A coût égal, il est à prévoir que les systèmes miniaturisés offriront la possibilité de faire des analyses plus nombreuses ou plus exhaustives.

35

La réduction de taille permet d'envisager des consommables « intégrés », qui sont conçus en fonction d'une fabrication potentielle à moindre coût, par exemple en étant adaptés à une fabrication de masse ou en utilisant des matériaux peu onéreux. Ces matériaux peu onéreux sont représentés non seulement par le silicium et le verre et leurs dérivés, mais aussi par les plastiques

Par ailleurs, la miniaturisation n'apporte pas directement la flexibilité, par contre elle peut rendre économiquement viables des principes d'analyse flexibles qui seraient restés trop coûteux en restant fabriqués aux côtes d'un grand format. Par exemple, la miniaturisation peut rendre économiquement pertinents des systèmes d'analyse d'ADN où l'utilisateur décide de ses sites d'amplification sur l'ADN et analyse à volonté les fragments amplifiés. Ces systèmes-là sont plus flexibles que ceux fonctionnant par hybridation où des oligonucléotides prédéterminés et non interchangeables sont fixés sur un support d'analyse.

Les appareils miniaturisés utilisant moins de réactifs représentent aussi un avantage potentiel sur le plan environnemental : moins de réactifs toxiques, moins de pollution.

Etat Actuel de l'Art dans les connexions micro-fluidiques:

Lorsqu'on envisage des analyses miniaturisées, il est important pour les connexions fluidiques entre les diverses parties du système:

- * d'opter pour des options qui permettent d'éviter l'évaporation (Mayer G, Köhler M, *Micro-mechanical compartments for biotechnological applications: fabrication and investigation of liquid evaporation. Sensors and Actuators A*, 1997, 202 - 207).

Des solutions pour lutter contre l'évaporation existent comme des systèmes étanches, ou en atmosphère saturée d'humidité, ou avec utilisation de ménisques d'huiles en surface des chambres de réaction. Mais aucune d'entre elles ne résout la difficulté de conserver l'étanchéité des connexions entre deux parties d'un système d'analyse

- * d'opter pour des options qui permettent d'éviter les contaminations.

Des développements ont amené à proposer certaines parties du système d'analyse avec un degré élevé de miniaturisation. Les configurations actuelles de connexion font appel à des juxtapositions et à des superpositions de composants aplatis connectés de proche en proche par des connecteurs placés sur les surfaces supérieures ou inférieures desdits composants aplatis.

La Figure 1A montre un dispositif microfluidique pouvant être utilisé en l'Etat Actuel de l'Art. Ledit dispositif est à trois étages constitués des modules plats (a), (b) et (c) pourvus de microcanaux parallèles à leur surface. Les trois étages sont connectés par des micro-canaux perpendiculaires à la surface desdits modules plats.

La Figure 1 B montre un dispositif microfluidique pouvant être utilisé en l'Etat Actuel de l'Art. Ledit dispositif connecte deux modules plats pourvus de micro-canaux parallèles à leur surface avec des connexions assurées par des micro-canaux perpendiculaires à la surface desdits modules plats.

Les publications et brevets suivants illustrent ces configurations de connexions:

* Flexible packaging and interconnect scheme for microfluidic systems, SPIE Proceedings, 3606-16, pp111-118.

* Kovacs et al.; Novel interconnection technologies for integrated microfluidics systems.

5 Proceedings of the Solid-State sensor and Actuator Workshop, Hilton Head, South Carolina, 1998, June 8-11, pp 112-115.

* VerLee D, Alcock A, Clarl G et al.. Fluid circuit technology: integrated interconnect technology for miniature fluidic devices. Proceedings of Solid State Sensors and Actuator Workshop, Hilton Head Island, SC, pp 9-14, 1996.

10 * González C, Pan JY, Collins SD, Smith RL. Packaging technology for miniature IVD instrumentation. MD&DI April 1998.

* González C, Smith RL, Collins SD. Fluidic interconnects for modular assembly of chemical microsystems. Proceedings of 1997 International Conference on Solid State sensors and Actuators, Chicago, Institute of Electrical and Electronics Engineers, 1997, 15 pp527-530.

* Man PF, Jones KD, Mastrangelo CH. Microfluidic plastics interconnects for multi-bioanalysis chip modules. SPIE vol 3224, pp196- 200.

* Karger et al., Microscale fluid handling system, US Patent 5 872 010,

* Kovacs GTA, Micromachined fluidic coupler, US Patent 5 890 745

20 * Zanzucchi PJ, Cherukuri SC, Mc Bride SE. Partitioned microelectronic and fluidic device array for clinical diagnostics and chemical synthesis. US Patent 5585069.

* Cherukuri SC, Demers RR, Fan ZH, Levine AW, Mc Bride SE, Zanzucchi PJ. Method and system inhibiting cross-contamination in fluids of combinatorial chemistry device. US Patent 5603351.

25 * Bings NH, Wang C, Skinner CD, Colyer CL, Thibault P, Harrison DJ. Microfluidic devices connected to fused -silica capillaries with minimal dead volume. Anal. Chem. 1999, 71, 3292-3296.

* Elwenspoek M, Lammerink TSJ, Miyake R, Fluitman JHJ. Towards integrated microliquid handling systems. J. Micromech. Microeng. 1994, 4, 227-245.

30

Les configurations actuelles des connexions des dispositifs miniaturisés ne permettent pas de connecter des micro-arrays ou des macro-arrays avec des Lab-on-a-chip (laboratoires sur puce) avec compacité, et souffrent de ruptures dans les connexions fluidiques, matérialisées par des phases de pipetage avec exposition des analytes à l'air libre, ce qui entraîne des 35 problèmes d'évaporation et de contamination. La Figure 1C illustre une configuration où une rampe de pipetage multipipette (1776) dispense les réactifs sur un micro-array (1777).

Parallèlement à cela, les Lab-on-a-chip actuels ne peuvent pas directement alimenter des micro-arrays ou des macro-arrays ou être alimentés directement par eux.

Les différentes architectures adoptées jusqu'à présent pour des articulations entre les différentes parties d'un micro- système microfluidique d'analyse chimique ou biochimique ou biologique ne sont pas en mesure d'apporter la compacité souhaitée, surtout lorsque certains composants ne peuvent pas, pour les raisons décrites précédemment, être miniaturisés et qu'ils doivent par conséquent rester à une macro-échelle.

En l'Etat Actuel de l'Art , aucune solution proposée ne résout la difficulté de conserver une architecture compacte des connexions tout en gardant l'étanchéité desdits connexions entre deux parties d'un système d'analyse ou de process microfluidique.

Pourtant, le manque de compacité des connections entre dispositifs miniaturisés rend difficile l' analyse de macrovolumes d'échantillons prélevés à une macroéchelle avec des réactifs que l'on souhaite utiliser en très petites quantités. L'insuffisance de compacité des connexions entre dispositifs miniaturisés rend également difficiles les configurations massivement parallèles recherchées pour des hautes cadences d'analyse, en particulier sur un grand nombre d'échantillons. Elle rend difficiles l'isolement et la manipulation de microvolumes ou de nanovolumes, ainsi que la précision de l'analyse, à cause des fortes contraintes physico-chimiques comme la diffusion et les phénomènes non désirés d' électro-osmose, alors que dans le même temps la miniaturisation rehausse l'attention qu'on doit apporter aux forces de capillarité et de l'hydrophobicité des contenants. Les difficultés constatées lorsque des connexions entre dispositifs miniaturisés manquent de compacité viennent aussi des contraintes architecturales comme celles des volumes morts dans les connexions, et des difficultés de micropositionnement sur des architectures dispersées. L'insuffisance de compacité des connexions entres systèmes miniaturisés rend difficile la diminution du coût de l'instrumentation, la fabrication de masse des consommables en vue de la diminution de leur coût, la conception de consommables intégrés où plusieurs étapes de l'analyse sont effectués sur le même support miniaturisé, le retour à un système compact pour la détection des analytes, utile pour être adapté à une détection de type "biopuces".

En l'Etat actuel de l'Art, les différentes architectures adoptées jusqu'à présent des articulations entre les différentes parties d'un microsystème microfluidique d'analyse chimique ou biochimique ou biologique montrent un manque d'adaptation à la vie du consommable: i) fabrication, ii) utilisation suite aux prélèvements des échantillons iii) analyse des échantillons.

En effet, des assemblages très compacts de consommables destinés à l'analyse de très nombreux échantillons peuvent être mis à profit pour la fabrication à l'usine et lors des phases d'analyses massivement parallèles. Par contre, ces assemblages compacts de consommables n'ont pas d'intérêt lors des phases de prélèvement sur de très nombreux échantillons. Ces phases de prélèvement ont lieu soit chez le malade ou dans l'environnement

dans lequel est prélevé l'échantillon, soit au dispensaire au laboratoire d'analyse et sont par nature des étapes dispersées dans le temps et dans l'espace.

En d'autres termes, en l'Etat Actuel de l'Art, rien dans la conception des consommables intégrés ne s'adapte véritablement au fait que dans la vie dudit consommable, la fabrication à l'usine est une étape de resserrement dans le temps et de concentration dans l'espace, l'étape de prélèvement est une étape de dispersion spatio-temporelle, l'étape d'analyse au laboratoire peut être à nouveau une phase de resserrement spatio-temporel.

En l'Etat actuel de l'Art, les différentes architectures adoptées jusqu'à présent des articulations entre les différentes parties d'un microsystème microfluidique d'analyse chimique ou biochimique ou biologique montrent un décalage entre le potentiel d'utilisation de très petits volumes qui seraient suffisants pour effectuer des détections (certaines techniques de détection permettraient d'utiliser quelques nanolitres seulement, voire moins) et les quantités réellement utilisées pour les mélanges réactionnels (souvent des microlitres). Ceci est dû à un déficit de savoir-faire dans les connexions pour manipuler et transporter les très petits volumes.

Finalement, dans les configurations proposées jusqu'ici, certaines possibilités techniques ne sont pas assez exploitées, comme par exemple celles montrées par les publications comme :

- "A new fabrication method for borosilicate glass capillary tubes with lateral inlets and outlets. Gréillat MA, Paoletti F, Thiébaud P, Roth S, Koudelka-Hep M, de Rooij NF. Sensors and Actuators A 60, 1997, 219-222 ". Cette publication montre qu'il est possible de fabriquer des microcanaux débouchant dans l'épaisseur et sur la tranche de micro-dispositifs plats.

- " Zanzucchi PJ, Cherukuri SC, Mc Bride SE.. Etching to form cross-over, non intersecting channel networks for use in partitioned microelectronic and fluidic device arrays for clinical diagnostics and chemical synthesis. US Patent 5681484". Ce brevet montre qu'il est possible de fabriquer des micro-canaux qui se croisent en s'évitant.

Etat Actuel de l'Art dans les techniques de microfabrication des systèmes miniaturisés d'analyse chimique, biochimique et biologique:

- Pour qu'un système d'analyse chimique ou biochimique puisse être miniaturisé, il faut d'une part que les conduits et composants qui guident ou reçoivent les fluides (microcanaux, micro-réservoirs, micro-mixers, micro-colonnes, etc) soient miniaturisés, d'autre part que les composants qui gèrent le parcours des fluides et des réactifs (micro-vannes, micropompes, micro-capteurs, micro-chauffeurs, etc) soient eux-aussi miniaturisés, et enfin que des connexions puissent s'établir à l'intérieur et vers l'extérieur du dispositif. (Elwenspoek M, Lammerink TSJ, Miyake R, Fluitman JHJ. Towards integrated microliquid handling systems. J. Micromech. Microeng. 1994, 4, 227-245. _ Verpoorte EMJ, van der Schoot BH, Jeanneret S, Manz A, Widmer HM, de Rooij NF. Three-dimensional micro flow manifolds for miniaturized chemical analysis systems. J. Micromech. Microeng. 1994, 4, 246-256, 1994 _ Schabmueller CGJ, Koch M, Evans AGR, Brunnschweiler A. . Design and fabrication of a microfluidic circuitboard. J. Micromech. Microeng. 1999, 9, 176-179. _ Lammerink TSJ, Spiering VL, Elwenspoek M, van den Berg A. Modular concept for fluid handling system. Proc. IEEE Micro Electro Mechanical Systems, 1996, San Diego pp389-384 _ Richter M, Prak A, Eberl M, Leeuwis H, Woias P, Steckenborn A. 1997. A chemical microanalysis system as a microfluid demonstrator, Proc. Transducers 97, IEEE Chicago, pp303-306. _ Kovacs GTA, Petersen K, Albin M. Silicon micromachining: sensors to systems. Analytical Chemistry, 1996, 407A - 412A _ Gravesen P, Branebjerg J, Jensen OS.. Microfluidics. A review. J. Micromech. Microeng. 1993. 3. 168-182. _ Shoji S, Esahi M. Microflow devices and systems. J. Micromech. Microeng. 1994. 4. 157-171. _ Büttgenbach S., Robohm C. Microflow devices for miniaturized chemical analysis systems. SPIE 1998, vol 3539, 51-61 _ Urban G, Jobst G, Moser I. Chemo-and biosensor microsystems for clinical applications. SPIE 1998. Vol 3539, 46-50).

Il pourra être envisagé des techniques et des fabrications séparées d'une part pour les supports avec micro-conduits et microcanaux, d'autre part pour les micro-composants, quitte à procéder à un montage, de préférence automatisé, en fin de fabrication.

Parmi les critères qui aident à orienter le choix d'un mode de fabrication pour une pièce donnée d'un dispositif miniaturisé d'analyse chimique ou biochimique figure le ratio d'aspect (aspect ratio en anglais) qui représente l'aptitude à respecter les côtes d'un plan en trois dimensions, en particulier à respecter un profil à partir de lignes brisées et non pas à partir de courbes

La fabrication des systèmes miniaturisés, au moins dans une première phase de fabrication, part la plupart du temps de supports plans et plats (parallèles à un plan et peu épais), dits en

2D, où l'essentiel des composants est fabriqué à partir de gravures, d'ablations et de dépôts sur surface plane.

5 La possibilité existe aussi maintenant de faire des composants de moins en moins plans et plats tout en respectant de plus en plus finement un profil de fabrication. Ceci est obtenu entre autres grâce à l'amélioration des techniques subtractives (gravure chimique, ablation physique), à l'amélioration des techniques additives (dépôts tels que électrodéposition (electroplating), electroless plating, par vapeur chimique (CVD et PEVCD)) et enfin à l'amélioration des techniques de moulage et d'estampage.

10 Très souvent cependant, les techniques de micro-usinage d'une surface plane n'ont pas assez progressé soit dans la profondeur limite d'usinage, soit dans les techniques de dépôt ou de moulage pour sculpter des dispositifs où des formes en 3D avec un rapport élevé hauteur/surface de base sont requises.

15 Une solution possible consiste en des assemblages de plusieurs pièces, que l'on peut appeler «sous-composants», qui ont un degré de planéité et de platitude suffisant pour être accessibles aux techniques d'usinage d'une surface plane. Dans certaines configurations, on fabrique des sous-composants juste assez plans et juste assez plats pour pouvoir être micro-fabriqués. Puis on les superpose et assemble par fusion ou collage après un éventuel emboîtement ou enclenchement, ce permet de reconstituer le micro-système voulu (US
20 Patent N° 5 932 315: Microfluidic structure assembly with mating microfeatures _ US Patent N° 5 611 214. Microcomponent sheet architecture _ US Patent 5252294. Micromechanical structure).

Pour que cette solution soit applicable, il faut entre autres choses que le micro-système voulu puisse tenir dans volume plus ou moins aplati représenté par la superposition de sous-
25 composants eux-mêmes nettement aplatis.

Mais il arrive aussi que la fabrication de certains composants ne puisse pas faire appel à des techniques de micro-usinage des surfaces planes. Ce peut être le cas parce que les formes sont trop sophistiquées pour être techniquement réalisables ou pour être fabriquées par ces techniques à un coût raisonnable. Ce peut aussi être le cas parce que la fonction demandée à
30 ces composants s'accommode mal de la miniaturisation elle-même ou des techniques de miniaturisation. La conséquence d'une telle situation est que ces composants vont rester à une macro-échelle, et que le packaging du micro-système devra être conçu assembler ou connecter des macro-pièces avec des micro-pièces. (van der Schoot BH, Interfacing micro and macro mechanical worlds. J. Micromech. Microeng. 1995, 5, 72-73).

35 Parmi les très nombreuses techniques de micro-fabrication figurent entre autres des techniques de gravure chimique humide de photolithographie, de gravure sèche avec divers rayonnements photoniques ou particuliers, de micro-façonnage avec micro-outillages ou lasers, de découpage, d'ablation, d'assemblage par fusion ou d'assemblage anodique, de

collage, de soudure, de moulage, d'estampage à chaud (hot-embossing en anglais), de poinçonnage, de forage, d'électrodéposition, de dépôt de vapeur chimique, de fabrication par progression par feuilles successives (lamination en anglais).

- 5 La gravure humide est appliquée depuis une quarantaine d'années au silicium et à ses dérivés dans l'industrie de la micro-électronique. Elle est peut être isotrope. Elle peut aussi être anisotrope lorsqu'on cherche à profiter de l'orientation des cristaux et des propriétés des substances gravantes pour maîtriser sa direction. (Sato K., Shikida M, Yamashiro M, Tsunekawa M, Ito S. Characterization of anisotropic etching properties of single crystal silicon: surface roughening as a function of crystallographic orientation. the 11th IEEE International Workshop on MEMS, Heidelberg, Germany, 1998, 201-206).

10 Les techniques de gravure humide tant isotropes qu'anisotropes possèdent de nombreuses variantes. En effet, les nouvelles connaissances en physique des matériaux, chimie orbitale, physique des rayonnements, dopage des matériaux, permettent de tirer profit de la structure atomique de différents matériaux utilisés, aident à concevoir des méthodes de contrôle de la direction, de la profondeur et de l'arrêt des gravures sur différentes couches et suggèrent de nouvelles pistes pour de nouvelles techniques .

Chacune des techniques citées possède de nombreuses variantes dont l'éventail ne cesse de se développer à un rythme soutenu.

20 Les nouvelles connaissances en traitement de surface permettent d'affiner les qualités demandées aux matériaux en cours de fabrication ou les qualités demandées au produit fini. Les nouvelles connaissances en thermophysique et thermochimie différentielle entre deux matériaux suggèrent des nouvelles techniques de fusion, de moulage, d'estampillage, de poinçonnage, en particulier des plastiques.

25 La microfabrication des polymères par stéréolithographie est venue grossir le champ de ces techniques, en particulier pour le prototypage rapide en 3D.

Selon que l'on grave un matériau dans sa masse ou que l'on grave seulement des couches superficielles, on parle respectivement de "bulk micromachining" et de "surface micromachining".

30 Toutes ces techniques de micro-fabrication sont applicables non seulement à la fabrication des produits finis, mais aussi à celles des outils utilisés pour effectuer ces micro-fabrications, ainsi qu'aux micro-moules et aux micro-matrices d'estampage à chaud utilisés pour micro-répliquer en masse un micro-objet.

35 Parmi les autres critères qui vont aider à sélectionner un mode et un matériau de fabrication figurent les qualités intrinsèques des matériaux composant l'objet fini, et les perspectives de maîtrise des coûts de fabrication.

Certaines techniques supposent un mode de fabrication unitaire, aujourd'hui peu adapté à la fabrication de masse: gravure sèche par rayonnements photoniques ou particulaires (Bean. Anisotropic etching of silicon. 1978. vol ED-25(10), pp 1185-1193. IEEE Transactions of Electron devices.), ablation lasers, gravure avec micro-pointe.

- 5 Mais ces techniques à vocation unitaire peuvent être utilisées comme première étape dans un process de fabrication de masse d'objets en plastique ou en céramique ou en métal selon des procédés appelés "par réplication" (Niggemann M., Ehrfeld W., Weber L.. Fabrication of miniaturized biotechnical devices. SPIE Conference on Micromachining and Microfabrication Process Technology IV, Santa Clara, California, Sept 1998, vol 3511, pp 204 - 213 _ Ruprecht R, Bacher W, Hausselt JH, Piottter V. Injection Molding of LIGA and LIGA-similar microstructures using filled and unfilled thermoplastics. SPIE, vol 2639, pp146-158 _ Fleming JG, Barron CC, Novel silicon fabrication process for high aspect ratio micromachined parts, SPIE vol 2639, 185-190 _ Keller CG, Howe RT. Nickel-filled HEXSIL thermally actuated tweezers, 8th International Conference on Solid-State Sensors and Actuators, Stockholm, Sweden, 1995, June 25-29, pp 376-379. _ Selvakumar A, Najafi K, High density vertical comb array microactuators fabricated using a novel bulk/polysilicon trench refill technology, Solid State Sensor and Actuator Workshop, Hilton head , 1994, SC June 13-16, pp 138-141 _ Becker H., Dietz W.. Microfluidic devices for μ -TAS applications fabricated by polymer hot embossing. Proceedings of SPIE. Microfluidic Devices and Systems. 21-22 sept 1998, Santa Clara, pp177-182 _ Grzybowski BA, Haag R, Bowden N, Whitesides GM. Generation of micrometer-sized patterns for microanalytical applications using a laser direct-write method and microcontact printing. Anal. Chem, 1998, 70, 4645-4652 _ Martynova L, Locascio E, Gaitan G, Kramer W, Christensen RG, MacCrehan WA.. Fabrication of plastic microfluid channels by imprinting methods. Anal. Chem. 1997, 69, 4763-4789)

- On peut en effet tirer de ces techniques à vocation unitaire un profit considérable pour micro-fabriquer des masters de réplication (par exemple des micro-moules pour moulage par injection ou pour moulage réactif, ou des micro-matrices d'estampage à chaud), à condition de réunir deux qualités: un ratio d'aspect élevé et une surface compatible avec les exigences du process de réplication. En effet, certaines étapes dans la réplication sont cruciales, en particulier la séparation de la matrice de réplication de l'objet nouvellement répliqué. Cependant, la complexité du process choisi pour fabriquer une matrice de réplication est à prendre en compte. Par exemple, on peut fabriquer avec une très grande précision un micro-moule de moulage par injection ou une micro-matrice d'estampage à chaud avec la technique LIGA, où un rayonnement synchrotron issu d'une machinerie très onéreuse, très rare et très lourde, est utilisé dans les premières étapes. Mais de nouvelles techniques de gravure sèche et surtout de gravure humide avec des performances accrues peuvent se révéler plus souples avec des ratios d'aspect qui se rapprochent de plus en plus de la technique LIGA. Ainsi le gravure humide anisotrope a beaucoup progressé (Hölke A., Henderson HT. Ultra-deep

anisotropic etching of (110) silicon; J. Micromech. Microeng. 1999, 9, 51-57). D'autres résultats montrent aussi un progrès dans les performances de la gravure humide isotrope (Wet chemical isotropic etching procedures of silicon - a possibility for the production of deep structured microcomponents. Schwesinger N, Albrecht A.. SPIE vol 3223, p 72-79).

- 5 Quant aux techniques à vocation unitaire, certaines d'entre elles pourront être adaptées à la fabrication en masse lorsque les instruments de fabrication eux-mêmes qui servent à les mettre en oeuvre seront miniaturisés et pourront être utilisés de manière massivement parallèles. C'est une perspective proche pour l'ablation laser (grâce à la fabrication de micro-lasers) et la gravure par micropointe, plus lointaine pour certaines techniques de gravure
- 10 sèche.

- Aujourd'hui la fabrication de masse est plutôt réservée aux techniques qui ont naturellement cette vocation, dont entre autres: gravure humide sur silicium et dérivés, et sur verres, photolithographie UV sur photorésists, fabrication par progression par couches successives
- 15 de polymères avec utilisation de couches sacrificielles selon Webster et Mastrangelo cités ci-après en référence, moulage de poly(dimethylsiloxane) (PDMS), moulage de plastiques par injection avec micro-moule, moulage de céramiques et de métaux, estampage à chaud de polymères avec micro-matrice d'estampage.

- 20 Comptant parmi ces dernières, la gravure humide est désormais appliquée à tous types de dérivés du silicium et au quartz, ainsi qu'aux différents types de verre (par exemple pyrex, verres boro-phospho-silicatés, etc).

- En matière de microfluidique, un critère important est la compatibilité avec l'utilisation de la
- 25 micro-électrophorèse, de la micro-électrophorèse 2D et de la micro-électro-chromatographie pour séparer les molécules. Est importante aussi et surtout la compatibilité avec l'électro-osmose pour mouvoir des fluides, cette technique ayant l'avantage d'éviter des composants telles que microvannes et micropompes. Comme la micro-électrophorèse et la micro-électrophorèse 2D, l'électro-osmose ainsi que la micro-électro-chromatographie alliée à
- 30 l'électro-osmose nécessitent de gros voltages. En conséquence, elles sont incompatibles en pratique avec l'utilisation du silicium.

- Par contre, elle sont compatibles avec les verres et les plastiques. (Manz A., Effenhauser CS, Burggraf N, Harrison DJ, Seiler K, Fluri K. Electroosmotic pumping and electrophoretic separations for miniaturized chemical analysis systems. J. Micromech. Microeng., 1994, 4,
- 35 257-265. - Mac Cormick RM, Nelson JR, Alonso-Amigo MG, Benvegna DJ, Hooper HH. Microchannel electrophoretic separations of DNA in injection-molded plastic substrates. Anal. Chem., 1997, 69, 2626-2630 _ Jacobson SJ, Kutter JP, Culbertson CT, Ramsey JM. Rapid electrophoretic and chromatographic analysis on microchips, μ -TAS 1998, Banff, Canada, 315-318. _ Microfabricated liquid chromatography columns based on collocated

monolith support structures, μ -TAS 1998, Banff, Canada, 451-455. _ Paulus A., Williams SJ, Sassi AP, Kao PH, Tan H, Hooper HH. Integrated capillary electrophoresis using glass and plastic chips for multiplexed DNA analysis, pp 94-103. SPIE Proceedings Vol 3515 #3515-08. _ PM Martin, DW Matson, Bennett WD, Hammerstrom DJ. Fabrication of plastic
5 microfluidic components. Polymer-based microfluidic analytical devices. SPIE Proceedings Vol 3515 # 3515-19).

Toutefois on peut envisager d'utiliser d'autres forces que la force électro-osmotique pour
mouvoir les liquides où l'utilisation de micro-vannes et micropompes peut être minimisée,
10 comme la gravité, la force centrifuge (Madou MJ, Kellogg GJ: The LabCD: a centrifuge-based microfluidic platform for diagnostics. SPIE vol 3259, pp 80-93).

D'autres modes de propulsion de liquides peuvent être envisagés comme la force thermo-capillaire (Burns MA, Mastrangelo CH, Sammarco T, Man FP, Webster JR, Johnson BN,
15 Foerster B, Jones D, Fields Y, Kaiser AR, Burke DT. Microfabricated structures for integrated DNA analysis. P.N.A.S. 1996, vol. 93, pp5556-5561), ou les forces couplées à des alternances surfaces ou raies hydrophobes-surfaces ou raies hydrophiles (Jones DK, Mastrangelo CH, Burns MA, Burke DT. Selective hydrophobic and hydrophilic texturing of surfaces using photolithographic photodeposition of polymers. SPIE vol 3515, 136- 143 _
20 Eastman Kodak.. Device for fluid supply of a micro-metering device; US Patent N° 5805189 _ Beckton Dickinson. DNA microwell device and method.US Patent N° 5795748).

Par ailleurs, une publication récente (Characterization of silicon-based insulated channels for capillary electrophoresis, Van den Berg et al., μ -TAS 98, Canada, pp-327-330) montre que
25 des travaux sont entrepris pour faire acquérir au silicium une compatibilité avec de gros voltages, mais la technique de fabrication employée est une gravure sèche (deep reactive ion etchnig), donc à vocation unitaire.

La transparence, qualité recherchée en analyse biologique, est une qualité partagée entre les
30 verres (Kricka L, Wilding P, et al.. Micromachined Glass-Glass Microchips for In Vitro Fertilization, Clinical Chemistry, 1995, 41, 9, 1358-1359) et certains plastiques.

Certains verres ayant les bons compromis de conditions de dopage et d'expansion thermique, ont la qualité de pouvoir s'assembler facilement au silicium (Albaugh KB, Rasmussen DH,
35 "Mechanisms of anodic bonding of silicon to pyrex glass. Proc IEEE Solid State Sensors and Actuators Workshop. 1988. 109-110).

La gravure humide sur verre, par nature isotrope, est parfaitement maîtrisée (A new fabrication method for borosilicate glass capillary tubes with lateral inlets and outlets. Grétilat MA, Paoletti F, Thiébaud P, Roth S, Koudelka-Hep M, de Rooij NF. Sensors and

Actuators A 60, 1997, 219-222. _ Corman T, Enoksson P, Stemme G. Deep wet etching of borosilicate glass using an anodically bonded silicon substrate as mask J. Micromech. Microeng., 1998, 8, 84-87.)

5 Comparés aux plastiques, les verres offrent entre autres pour l'analyse biochimique la compatibilité avec la détection par fluorescence et un bon coefficient d'échange thermique. Ils sont gravés cependant uniquement selon un mode isotrope, ce qui par exemple limite aujourd'hui la forme des microcanaux sur verre à une forme circulaire.

10 Les plastiques, même s'ils ont une moindre compatibilité avec la détection par fluorescence et un moindre coefficient d'échange thermique que les verres, ont de nombreuses autres qualités, dont principalement le faible prix de revient.

Des travaux qui portent sur l'amélioration de la détection par fluorescence avec les plastiques et l'élimination des bruits de fond (en modulant la vitesse de migration des analytes et en
15 utilisant une source lumineuse LED) ont été rapportés par Wang Shau-Chun et Michael D. Morris de l'Université du Michigan à la 10^{ème} "Frederick Conference on Capillary Electrophoresis " en Octobre 1999.

20 Le très faible coût de fabrication des objets micro-fabriqués en plastique vient du faible prix de la matière première, de la simplicité des process de production qui peuvent être envisagés, entre autres du fait de l'aptitude à la réplique par moulage ou par estampage à chaud, voire même pour les plastiques photoresists à la photolithographie .

Un inconvénient des plastiques est en voie d'être surmonté: il était difficile de déposer le métal de la circuiterie électrique une fois le produit fini. Mais des solutions voient le jour,
25 comme le marquage avec une encre conductrice.

Parmi les plastiques, il est intéressant de faire la classification suivante:

- les photoresists, usinables entre autres par photolithographie, dont par exemple le PMMA
30 pour la lithographie aux rayons X, SU-8 (photoresist négatif) et Novolac de Hoescht et AZ 9260 (photoresists positif) pour la photolithographie UV (Lorenz H, Despont M, Fahrni N, LaBianca N, Renaud P, SU-8: a low-cost negative resist for MEMS, J. Micromech. Microeng, 1997, 7, 121-124. _ .Loechtel B, Maciossek A, Surface micro components fabricated by UV depth lithography and electroplating, SPIE vol 2639, 174-
35 184 _ Conédéra V, Le Goff B, Fabre N. Potentialities of a new positive photoresist for the realization of thick moulds, J. Micromech. Microeng, 1999, 9, 173-175. _ Guérin LJ, Bossel M, Demierre M, Calmes S, Renaud P. Simple and low cost fabrication of embedded microchannels by using a new thick-film photoplastic. Proceedings of Transducers, Chicago, USA, 1997, pp1419-1422.)

- les élastomères siliconés, dont le poly(dimethylsiloxane) (PDMS), utilisables entre autres par moulage simple, (Mac Donald JC, Duffy DC, Anderson JR, Chiu DT, Hongkai Wu, Schueller O, Whitesides GM, Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane), Electrophoresis 2000, 21, 27-40. _ Ocuvirk G, Munroe M; Tang T, Oleschuk R, Westra K, Harrison DJ, Electrokinetic control of fluid flow in native poly(dimethylsiloxane) capillary electrophoretic devices, Electrophoresis 2000, 21, 107-115.)
- un ensemble de plus en plus vaste usinable entre autres par moulage par injection et par emboutissage à chaud. Parmi ces derniers, on peut citer des polyamides (PA), des polycarbonates (PC), des polyoxyméthylènes (POM), le cyclopentadiène norbornène copolymère (COC), des polyméthylmethacrylates (PMMA), le polyéthylène basse densité (PE-LD), le polyéthylène haute densité (PE-HD), le polypropylène (PP), des polystyrènes (PS), le cyclooléfin copolymère (COC), le polyetheretherketone (PEEK). (Niggemann M., Ehrfeld W., Weber L.; Fabrication of miniaturized biotechnical devices, SPIE , vol 3511, pp 204 - 213 _ Becker H, Gärtner C, Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications, Electrophoresis 2000, 21, 12-26).
- D'autres plastiques encore peuvent être microfabriqués: le polybutylène téréphtalate (PBT), le polyphénylène ether (PPE), le polysulfone (PSU), le liquid crystal polymer (LCD), le polyetherimide (PEI). Le polyactide biodégradable peut aussi être microfabriqué.

Le PMMA et le PC sont couramment employés dans le moulage par injection et l'estampage à chaud. Le COC est couramment cité dans l'estampage à chaud.

Les procédés de fabrication de masse des plastiques sont très variés. On peut citer comme principaux procédés:

- l'impression par matrices filiformes (wire imprinting) (Locascio LF, Gitan M, Hong J, Eldefrawi M, Plastic microfluidic devices for clinical measurements, μ -TAS 1998, 367-370 _ Chen YH, Chen SH, Analysis of DNA fragments by microchip electrophoresis fabricated on poly(methyl methacrylate) substrates using a wire-imprinting method, Electrophoresis 2000, 21, 165-170)
- l'estampage à chaud (Hot embossing) (Becker H., Dietz W, Dannberg P. Microfluidic manifolds by polymer hot embossing for μ -TAS applications. μ -TAS 1998, Banff, Canada, 253-256. _ Kempen LU, Kunz RE, Gale MT. Micromolded structures for integrated optical sensors. SPIE vol 2639, 278-285.).

- le moulage par injection (Hagmann P, Ehrfeld W. Fabrication of microstructures of extreme structural heights by reaction injection molding, International Polymer Processing, 1989, Vol IV, N°3, pp 188-195. _ Weber L, Ehrfeld W, Freimuth H, Lacher M, Lehr H, Pech B. . Micro-moulding - a powerful tool for the large scale production of precise microstructures. Proc. SPIE Symp. Micromachining and Microfabrication, 1996, vol 2879, pp 156- 167.).
- le moulage simple pour les élastomères siliconés (Kumar A, Whitesides GM. Appl. Phys. Lett, 1993, 63, 2002-2004 _ Wilbur JL, Kumar A, kim E, Whitesides GM, Adv. Mat. 1994, 7, 600-604.).
- la photolithographie des photoresists, dont par exemple la lithographie aux rayons X pour le PMMA, la photolithographie UV pour le photopolymère Epson SU-8.
Dans cette dernière, trois procédés sont couramment utilisés (Renaud P., Van Lintel H, Heusckel M, Guérin L.. Photo-polymer microchannel technologies and applications. μ -TAS 1998, Banff. Canada, pp17-22.). Ils commencent toutes trois par le dépôt d'une première couche de SU-8 qu'on expose aux UV. Pour la fabrication d'un microcanal, la première couche de photoresist fait le fond dudit micro-canal à section rectangulaire. La deuxième couche de photoresist fait les parois verticales dudit micro-canal. La troisième couche de photoresist termine le capillaire en constituant la partie couvercle.
 - * le "fill process" . On procède par remplissage avec une couche sacrificielle, comme par exemple l'Araldite GT6063 de Ciba-Geigy entre la deuxième et la troisième couche de photoresist. En fin de process, la couche sacrificielle est dissoute.
 - * le "mask process" . On interpose une couche de métal sur la deuxième couche de photoresist qu'on ne développe pas. Cette deuxième couche de métal masque le microcanal. Une troisième couche de photoresist est déposée puis illuminée. Puis le photorésist est développé à l'intérieur et à l'extérieur dudit micro-canal.
 - * le "lamination process", un procédé sans dissolution, où l'on déroule une couche de film sec de SU-8 sur la construction faite à partir de la première couche de photoresist pour la sceller.
- la fabrication par progression par couches successives de polymères , avec utilisation de couches sacrificielles, dont par exemple le process utilisé par Webster JR, Burns MA, Mastrangelo CH, Man PF, Jones DK, Burke DT., (Webster JR, Burns MA, Burke DT., Mastrangelo CH , An inexpensive plastic technology for microfabricated capillary electrophoresis chips, μ -TAS 1998, 249-252), une technique qui part de parylène déposé sur du polycarbonate ou du silicium avec utilisation ultérieure de photorésist sacrificiel.

L'avantage de cette technique réside dans le scellement des microcanaux naturellement inclus dans la méthode.

La microfabrication par laser des plastiques est aussi possible, mais en tant technique
5 unitaire. Ce peut être par exemple l'ablation directe dans la masse ou la découpe d'un joint
que l'on glissera en sandwich entre deux couvercles.
Les traitements de surface de plastiques dépendent de l'application et du matériau utilisé. Par
exemple, il faut souvent rendre hydrophile une surface hydrophobe. Pour une application
d'analyse d'ADN, ou d'analyse de protéines, il faut éviter des liaisons avec le substrat par
10 des traitements de surfaces spécifiques respectivement à ces deux types d'analyse et
spécifiques du matériau choisi.

Pour assembler et sceller d'un couvercle des microfabrications en plastique, plusieurs
procédés existent. On peut citer entre autres:

- 15 - le scellement par déroulement à chaud d'une feuille recouvrante de PET d'environ 30
microns coatée avec une couche d'un matériau, le plus souvent un polymère que l'on
porte à son point de fusion pour qu'elle se mélange avec le substrat,
- le scellement d'un couvercle ou l'assemblage d'une partie complémentaire par collage, ou
par pression à chaud, ou par soudure au laser, ou par l'emploi d'ultrasons, ou par l'emploi
20 de plasmas, etc.

25

30

35

FIGURES:

La Figure 1A montre un dispositif microfluidique pouvant être utilisé en l'Etat Actuel de l'Art.

5

La Figure 1 B montre un dispositif microfluidique pouvant être utilisé en l'Etat Actuel de l'Art.

10

La Figure 1C montre un dispositif de pipetage (1776) dispensant des réactifs sur un micro-array ou un macro-array (1777) pouvant être utilisé en l'Etat Actuel de l'Art.

La Figure 2A montre un micro-puits classique d'un micro-array ou d'un macro-array.

15

La Figure 2B montre comment on peut reconverter un micro-canal (41) en micro-puits (42) obturable à la fois profond et à section réduite.

La Figure 2C montre comment une connexion d'un élément microfluidique (4) est engagée par le dessous et par le dessus desdits micropuits (42).

20

La Figure 2D montre un micropuits (42) mâle profond et étroit.

La Figure 3A montre en coupe un micropuits (42) obtenu par reversion d'un micro-canal (41) traversant de part en part un module élémentaire plat (1) et débouchant dans l'épaisseur et sur la tranche dudit module élémentaire plat (1).

25

La Figure 3B montre en perspective plusieurs micro-canaux (41) parallèles traversant de part en part un module élémentaire plat (1) et débouchant dans l'épaisseur et sur la tranche dudit module élémentaire plat (1), de telle sorte qu'on obtient une ligne (2119) de micropuits (42) du micro-array ou macro-array de l'invention.

30

La Figure 3C montre la superposition précise desdits modules élémentaires plats (1) qui portent chacun une ligne (2119) de micropuits (42) pour former ledit micro-array ou du macro-array multibloc (3119) de l'invention.

35

La Figure 4A montre un module élémentaire plat (1) où les microcanaux (41) sont pourvus de portions élargies.

La Figure 4B montre en perspective un module élémentaire plat (1) où les microcanaux (41) sont pourvus de portions élargies.

La Figure 4C montre en perspective le micro-array (3119) formé par empilement des modules élémentaires plats (1) dont les microcanaux (41) sont pourvus de portions élargies.

- 5 La Figure 5 montre une vue de dessus d'un micro-array ou macro-array multibloc (319) de l'invention constitué par l'empilement de modules élémentaires plats (110).

La Figure 6 montre une vue de face d'un module élémentaire plat (110) de l'invention.

- 10 La Figure 7 montre une vue de dos dudit module élémentaire plat (110) de l'invention.

La Figure 8 montre une vue de dessous dudit micro-array ou macro-array multibloc (319) de l'invention.

- 15 La Figure 9 montre une vue de profil dudit micro-array ou macro-array multibloc (319) de l'invention.

La Figure 10 représente le détachement de parties détachables (145) desdits modules élémentaires plats (110), vu de profil.

- 20 La Figure 11 représente une vue de dessus dudit micro-array ou macro-array avec lesdites parties détachables (145) connectées aux sous parties (155) desdits modules élémentaires plats (110).

- 25 La Figure 12 représente lesdites parties détachables (145) seules, vues de dessus.

La Figure 13 représente en vue de profil un micro-array ou macro-array multibloc (318) formé par empilement desdites parties détachables (145).

- 30 La Figure 14 représente en vue de dessus un micro-array ou macro-array multibloc (318) formé par empilement desdites parties détachables (145).

- La Figure 15 représente en vue de profil la connexion face à face d'un premier micro-array ou macro-array multibloc (1318) constitué par empilement de parties détachables (1145) de modules élémentaires plats avec un deuxième micro-array ou macro-array multibloc (2318) constitué par empilement d'autres modules élémentaires plats (2145).
- 35

La Figure 16 représente en vue de face la connexion face à face d'un premier micro-array ou macro-array multibloc (1318) constitué par empilement de parties détachables (1145) avec

avec un deuxième micro-array ou macro-array multibloc (2318) constitué par empilement d'autres modules élémentaires plats (2145).

- La Figure 17 montre une connexion orthogonale de deux modules élémentaires plats de l'invention, lesdits modules élémentaires plats étant pourvus de sous-parties détachables.
- La Figure 18 montre une connexion orthogonale de deux micro-arrays ou macro-arrays multiblocs constitués respectivement par empilement des modules élémentaires plats de la figure 17.
- La Figure 19 montre d'abord une connexion orthogonale de deux modules élémentaires plats de l'invention, le premier des deux dits modules élémentaires plats étant pourvus de sous-parties détachables. Elle montre ensuite une connexion directe d'un assemblage premier module élémentaire plat-deuxième module élémentaire plat avec un troisième module élémentaire plat.
- La Figure 20 montre une connexion orthogonale de deux micro-arrays ou macro-arrays multiblocs de l'invention, le premier micro-array ou macro-array étant constitué par empilement des assemblages premiers modules élémentaires plats-deuxième modules élémentaires plats de la figure 19, et le deuxième micro-array ou macro-array étant constitué par empilement des troisièmes modules élémentaires plats de la figure 19.
- La Figure 21 montre d'abord une connexion directe de deux modules élémentaires plats de l'invention, le premier des deux dits modules élémentaires plats étant pourvus de sous-parties détachables. Elle montre ensuite une connexion orthogonale d'un assemblage premier module élémentaire plat-deuxième module élémentaire plat avec un troisième module élémentaire plat.
- La Figure 22 montre les connexions de micro-arrays des micro-arrays ou macro-arrays multiblocs de l'invention constitués respectivement par empilement des modules élémentaires plats de la figure 21.
- La Figure 23 montre d'abord une connexion directe de deux modules élémentaires plats de l'invention, le premier des deux dits modules élémentaires plats étant pourvus de sous-parties détachables. Elle montre ensuite une connexion orthogonale d'un assemblage premier module élémentaire plat-deuxième module élémentaire plat avec plusieurs modules élémentaire plats juxtaposés d'un troisième type.
- La Figure 24 montre les connexions des micro-arrays ou macro-arrays multiblocs de l'invention constitués respectivement par empilement des modules élémentaires plats de la figure 23.

La Figure 25 A montre un micro-array ou macro-array multibloc (4319) de l'invention est formé par empilement de modules élémentaires plats (4110) pourvus de microcanaux (41) dont les micro-mélangeurs (4019) sont situés sur les sous-parties (4155) desdits modules élémentaires plats (4110).

5

La Figure 25 B, puis la Figure 25 C montre comment s'obtient une densité maximale des micro-arrays multiblocs de l'invention, avec un micro-array multibloc (4318) formé par empilement des parties détachables (4145) desdits modules élémentaires plats (4110).

10 La Figure 26 A, la Figure 26B et la Figure 26C montrent qu'on peut faire des opérations de transfert de réactifs en série grâce à des micro-arrays ou un macro-arrays multibloc (20317), "équivalents" aux micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (4319) ayant servi à la préparation des réactifs.

15 La Figure 27 montre un micro-array ou macro-array multibloc de haute densité (5319) formé directement par empilement de modules élémentaires plats (5110) très peu épais.

La Figure 28A, la Figure 28B, la Figure 28 C, la Figure 28D montrent comment une pièce intermédiaire transversale (30339) pourvue de micro-canaux peut être connectée entre un
20 empilement de modules élémentaires plats (21110) et un empilement de modules élémentaires plats (5110).

La Figure 29A montre en perspective un micro-array ou macro-array multibloc (6319) de l'invention avec obturateurs permettant d'isoler un compartiment d'un module élémentaire plat (6110) dudit micro-array ou macro-array multibloc (6319).
25

La Figure 29B montre une vue de face d'un module élémentaire plat (6110) dudit micro-array ou macro-array multibloc (6319) de l'invention avec lesdits obturateurs.

30 La Figure 30A montre une autre vue en perspective d'un micro-array ou macro-array multibloc (6319) de l'invention où apparaît le parallélisme des opérations, avec, à titre d'exemple, un circuit de lavage pendant la préparation des réactifs avant leur envoi en surface dudit micro-array ou macro-array multibloc (6319).

35 La Figure 30B montre une vue de face d'un module élémentaire plat (6110) dudit micro-array ou macro-array multibloc (6319) de l'invention, avec, à titre d'exemple, un circuit de lavage pendant la préparation des réactifs avant leur envoi en surface dudit micro-array ou macro-array multibloc (6319).

La Figure 31 montre une vue en perspective d'un micro-array ou macro-array multibloc (7319) de l'invention où apparaît le parallélisme des opérations, avec, à titre d'exemple, l'envoi d'un mélange réactionnel en surface dudit micro-array ou macro-array multibloc (6319)..

5

La Figure 32 montre une connexion d'un micro-array ou macro-array multibloc de l'invention avec un bloc multi-pipette.

10

La Figure 33A montre en perspective un micro-array ou macro-array multibloc de l'invention connecté à une pièce monobloc (555) d'aplanissement de surface.

La Figure 33B en coupe la connexion d'un micro-array ou macro-array multibloc de l'invention connecté à une pièce monobloc (555) d'aplanissement de surface.

15

La Figure 34 et la Figure 35 montrent en perspective comment un module élémentaire plat (6110) peut-être micro-fabriquée par l'assemblage de deux héli-modules élémentaires plats (611012).

20

La Figure 36A, la Figure 36B, la Figure 36C montrent une méthode de fabrication de tous les modules élémentaires plats de l'invention par superposition et fusion de sous-parties planes complémentaires, la sous partie plane supérieure faisant office de couvercle.

La Figure 36 A montre une première pièce, la Figure 36 B montre son couvercle, la Figure 36 C montre le micro-array ou macro-array multibloc de l'invention ainsi constitué.

25

La Figure 37A montre une sous-partie d'un module élémentaire plat.

La Figure 37B montre l'assemblage d'une sous-partie d'un module élémentaire plat avec sa partie complémentaire.

30

La Figure 37C montre un micro-array ou macro-array multibloc de l'invention constitué de l'empilement desdits modules élémentaires plats fabriqués par assemblage desdites parties complémentaires. La Figure 37 D représente par transparence le micro-array ou macro-array ainsi constitué.

35

La Figure 38 montre que lorsque des modules élémentaires plats (18110) ne présentent pas de composants, le support plat qui sert à fabriquer l'une de ses sous-parties complémentaires (1811012) peut être très mince et le micro-array ou macro-array constitué (18319) peut alors être relativement dense.

La Figure 39 montre que lorsque des modules élémentaires plats (19110) présentent des composants, la densité du micro-array ou un macro-array multibloc (19319) pouvant être constitué par empilement desdits modules élémentaires plats (19110) est limitée.

5 La Figure 40A représente un mode de réalisation de l'invention et réside dans des micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (13319) dédiés à l'analyse de fragments d'ADN avec une préparation intégrée avec extraction de l'ADN par chromatographie par échange d'anions puis déssalement sur microparticules magnétiques de gel de silice.

10 La Figure 40B et la Figure 40C montrent l'action d'un électro-aimant sur lesdites microparticules magnétiques.

La Figure 41A montre un autre mode de réalisation de l'invention et réside dans des micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (14319) dédiés à l'analyse de fragments d'ADN avec une
15 préparation intégrée avec extraction de l'ADN par chromatographie par échange d'anions puis déssalement sur matrices de gel de silice.

La Figure 41B montre un autre mode de réalisation de l'invention et réside dans des micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (15319) dédiés à l'analyse de fragments d'ADN avec une
20 préparation intégrée avec extraction de l'ADN sur matrices de gel de silice.

La Figure 42 montre la connexion orthogonale d'un élément plat de préparation des échantillons et réactifs avec un élément plat apportant un réactif spécifique dans un des micro-puits dudit élément plat de préparation des échantillons et réactifs.
25

La Figure 43 montre la connexion orthogonale d'un empilement d'éléments plats de préparation des échantillons et réactifs avec un empilement d'éléments plats apportant un réactif spécifique dans chacun des micro-puits desdits éléments plats de préparation des échantillons et réactifs.
30

La Figure 44 montre la connexion orthogonale d'un élément plat, en deux parties assemblables, de préparation des échantillons et réactifs avec un élément plat, en deux parties assemblables lui aussi, et apportant un réactif spécifique dans un des micro-puits dudit élément plat de préparation des échantillons et réactifs.
35

La Figure 45 montre la connexion orthogonale d'un empilement d'éléments plats, en deux parties assemblables, de préparation des échantillons et réactifs avec un empilement d'éléments plats, en deux parties assemblables eux aussi, et apportant un réactif spécifique

dans chacun des micro-puits desdits éléments plats de préparation des échantillons et réactifs.

5 La Figure 46 montre un élément plat de préparation des échantillons et réactifs capable de diriger une ligne de premiers aliquots de ladite préparation vers des macro-emplacements et capable de se connecter à un empilement de modules plats capables de reprendre chaque aliquot du module plat précédent pour l'aliquoter à nouveau sur des micro-puits.

10 La Figure 47 montre la connexion d'un élément plat de préparation des échantillons et réactifs capable de diriger une ligne de premiers aliquots de ladite préparation vers des macro-emplacements avec un empilement de modules plats capables de reprendre chaque aliquot du module plat précédent pour l'aliquoter à nouveau sur des micro-puits.

15 La Figure 48 montre le face à face entre une première ligne, au premier plan, de n empilements horizontaux de p modules plats identifiés individuellement de manière spécifique, avec une deuxième ligne, en arrière plan, de n empilements verticaux de p modules plats de réactifs spécifiques.

20 La Figure 49 montre la connexion orthogonale entre une première ligne, au premier plan, de n empilements horizontaux de p modules plats identifiés individuellement de manière spécifique, avec une deuxième ligne, en arrière plan, de n empilements verticaux de p modules plats de réactifs spécifiques, donnant lieu à n micro-arrays de np micro-puits, soit en tout $n^2 p$ micropuits, chacun des $n^2 p$ micro-puits ayant reçu l'un des np réactifs spécifiques

25 La Figure 50 montre la redistribution des modules plats des n empilements précédents de modules plats marqués différemment dans n nouveaux empilements regroupant les modules plats avec le même marquage individuel, chacun desdits empilement avec le même marquage individuel étant dédié à un seul échantillon.

30 La Figure 51 montre la connexion de n modules plats chacun à un seul échantillon avec n nouveaux empilements regroupant les modules plats avec le même marquage individuel, chacun des n échantillons pouvant rencontrer np réactifs spécifiques, les n empilements donnant lieu à n micro-arrays représentant au total $n^2 p$ micro-puits.

35 La Figure 52A montre une étape dudit process de préparation intégrée de l'ADN sur micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (15319) l'introduction dudit mélange de l'ADN purifié et du tampon d'amplification dans les micro-canaux dudit micro-array ou macro-array multibloc de l'invention.

La Figure 52B montre comme étape suivante dudit process de préparation intégrée de l'ADN sur micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (15319) une connexion dudit micro-array ou macro-array (15319) avec d'autres empilements de modules élémentaires plats (9245).

5

La Figure 52B montre comme étape suivante dudit process de préparation intégrée de l'ADN sur micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (15319) la déconnexion dudit micro-array ou macro-array (15319) avec d'autres empilements de modules élémentaires plats (9245).

10

La Figure 53 montre un empilement en biseau de modules élémentaires plats (40110) avec sous-parties (40145) pour une compatibilité avec une détection par microélectrophorèse avec par exemple une connexion à un empilement en biseau de modules élémentaires plats (40245) pourvus de micro-canaux pour micro-électrophorèse.

15

Les Figures 54A, 54B, 54C, 54D montrent qu'on peut synthétiser in situ dans les puits d'un micro-array ou macro-array monobloc (339) par exemple des octamers à partir de tetramers préfixés et de tétramers amenés par les microcanaux (41) desdits micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (319) de l'invention.

20

Les Figures 55A, 55B, 55C, 55D montrent qu'on peut synthétiser in situ dans les micro-puits (42) d'un micro-array ou macro-array multibloc (319) des octamers à partir de tetramers préfixés et de tétramers amenés par les microcanaux (41) desdits micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (319) de l'invention.

25

Les Figures 56A, 56B, 56C, 56D montrent qu'on peut synthétiser in situ dans des portions élargies des micro-canaux (41) d'un micro-array ou macro-array multibloc (319) des octamers à partir de tetramers préfixés et de tétramers amenés par lesdits microcanaux (41) desdits micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (319) de l'invention.

30

Les Figures 57A, 57B, 57C montrent qu'on peut synthétiser in situ dans les micro-puits d'un micro-array ou macro-array monobloc (338) des biopuces dans chaque micro-puits dudit micro-array ou macro-array monobloc (338) grâce à une connexion avec des micro-arrays ou macro-arrays multiblocs de l'invention.

35

Les Figures 58A, 58B, 58C montrent qu'on peut synthétiser des biopuces in situ dans chaque micro-puits d'un micro-array ou macro-array multibloc (319)

La Figure 59A montre comment un micro-array ou macro-array multibloc de l'invention peut être connecté à un micro-array monobloc de bouchons (340) qui viennent obturer les micro-puits (42) desdits micro-arrays ou macro-arrays multiblocs.

5 La Figure 59B montre comment un premier micro-array ou macro-array multibloc de l'invention peut être connecté à un autre micro-array ou macro-array de l'invention formé par empilement de modules élémentaires plats (1101) dont les micro-canaux sont pourvus de micro-vannes (396).

10 La Figure 59C montre comment un premier micro-array ou macro-array multibloc de l'invention peut être connecté à un autre micro-array ou macro-array multibloc de l'invention formé par empilement de modules élémentaires plats (1102) pourvus de dispositifs (398) qui créent une force électro-osmotique en établissant un potentiel électrique entre deux endroits des micro-canaux desdits de modules élémentaires plats (1102)

15 La Figure 59D montre comment un premier micro-array ou macro-array multibloc de l'invention formé par empilement de modules élémentaires plats (1) peut être connecté à un autre micro-array ou macro-array de l'invention formé par empilement de modules élémentaires plats (1103) dont les micro-canaux sont pourvus de deux micro-vannes (397).

20

DESCRIPTION DE L'INVENTION:

Les micro-arrays ou macro-arrays classiques dédiés à l'analyse chimique ou biochimique ou biologique sont généralement plans et plats, et fabriqués d'un seul bloc (monobloc).

25

Les micro-arrays ou macro-arrays de l'invention sont plans, multiblocs, épais, voire très épais, car ils utilisent la troisième dimension, la profondeur du micro-array ou du macro-array.

30 La présente invention concerne des macro-arrays multiblocs ou micro-arrays multi-blocs en trois dimensions intégrés dans une chaîne prête à l'emploi continue ultra compacte de synthèse ou d'analyse chimique, biochimique ou biologique.

35 Ces micro-arrays ou macro-arrays multi-blocs de l'invention intègrent dans leur architecture des Lab-on-a-Chip (laboratoires sur puces), ou bien, selon les configurations décrites dans l'invention, sont directement reliés ou connectables à ces Lab-on-a-Chip.

Le mot "Multibloc" s'oppose au mot "Monobloc". Il signifie que les "micro-arrays" ou "macro-arrays" de l'invention sont, à l'inverse des micro-arrays classiques en Analyse

Chimique, constitués de plusieurs pièces. Plus précisément, ils sont constitués de l'assemblage par superposition d'un nombre élevé de modules élémentaires identiques ou homologues.

5 Si l'on considère qu'un micro-array ou un macro-array est un quadrillage de puits ou de spots identiques, avec x lignes et y colonnes, chaque module élémentaire du micro-array ou du macro-array de l'invention a entre autres pour fonction de constituer en soi soit une colonne, soit une ligne dudit micro-array.

10 Les macro-arrays ou microarrays conçus selon la présente invention utilisent des micropuits obtenus reconversion de micro-canaux en micropuits.

La Figure 2A montre un micro-puits classique d'un micro-array ou d'un macro-array, dont la fonctionnalité souffre d'une exposition à l'air libre et donc de problèmes de contamination et d'évaporation.

15 La Figure 2B montre comment on peut reconvertir en micro-puit un micro-canal (41) plus ou moins long. Il suffit que ce micro-canal (41) traverse un support plus ou moins profond de part en part, et qu'à une extrémité dudit micro-canal, c'est à dire à un des orifices dudit micro-canal, on appose un élément quelconque obturateur (4) ou un dispositif quelconque pouvant
20 s'opposer au passage d'un fluide dans ledit micro-canal (41).

Ainsi que le montrent la Figure 3A et la Figure 3B, les macro-arrays ou micro-arrays conçus selon la présente invention utilisent des micropuits (42) obtenus par reconversion de micro-canaux (41) traversant de part en part un module élémentaire plat (1) et débouchant dans
25 l'épaisseur et sur la tranche dudit module élémentaire plat (1) par des orifices (42). Avec plusieurs micro-canaux (41) parallèles traversant de part en part un module élémentaire plat (1) et débouchant dans l'épaisseur et sur la tranche dudit module élémentaire plat (1), on obtient selon l'invention une ligne (2119) de micropuits du micro-array ou macro-array de l'invention, ainsi que le montre la Figure 3B. Selon l'invention, ainsi que le montre la Figure
30 3C, la superposition précise de ces modules élémentaires plats (1) qui portent chacun une ligne (2119) du micro-array ou du macro-array, va former le micro-array multibloc ou le macro-array multibloc (3119) de l'invention. Le nombre de modules élémentaires plats (1) empilés va représenter le nombre de lignes dudit micro-array ou du macro-array multibloc. Le nombre de puits (42) par module élémentaire, c'est à dire le nombre de microcanaux (41)
35 par module élémentaire plat, va représenter le nombre de colonnes du micro-array ou du macro-array multibloc (3119) de l'invention.

Les micro-puits obturables du micro-array ou macro-array de l'invention, à la fois profonds et à section réduite, diminuent la surface exposée à l'évaporation (voir Figure 2B). Une

connexion va pouvoir être engagée par le dessous et par le dessus desdits micropuits, ce qui va rendre la connexion étanche. (voir Figure 2C et Figure 2D). De plus, les micropuits du microarray ou du macro-array multibloc de l'invention peuvent être obturés des deux côtés, ce qui du coup transforme lesdits micro-puits en micro-récipients (voir Figure 2C).

- 5 Ainsi qu'il a été dit, pour reconvertir un microcanal (41) en micropuits (42) étroit et profond, le fonds dudit micropuits (42) est pourvu d'un moyen d'obturation provisoire. Lorsque cette configuration est alternée avec la configuration opposée à 180°C, on peut alimenter le micropuits du micro-array ou du macro-array de l'invention indifféremment par le dessous ou le dessus.
- 10 Un des avantages des micro-arrays ou macro-arrays multiblocs de l'invention réside dans le fait que chaque module élémentaire plat qui le constitue va pouvoir être configuré en "Lab-on-a-chip", c'est à dire en "laboratoires sur puces", ce qui permettra une alimentation du micro-array ou du macro-array avec des produits de réaction dont la préparation a été intégrée audit micro-array ou macro-array multibloc sans phase d'exposition à l'air libre et
- 15 sans évaporation ni contamination.

La Figure 4A montre des modules élémentaires plats (1) où les microcanaux (41) sont, selon l'invention, pourvus de micromélangeurs (19) et de portions élargies. Des portions élargies (1701) desdits micro-canaux (41) peuvent aussi comporter des microcolonnes (Cf Swedberg S, Kaltenbach P, Witt K, Bek F, Mittlestadt LS. Fully integrated miniaturized planar liquid sample handling and analysis device. US Patent 5571410. He B, Tait N, Regnier F. Fabrication of nanocolumns for liquid chromatography. Anal. Chem, 1998, 70, 3790-3797. Pluskal MG, Microscale sample preparation, Nature Biotechnology, 2000, vol 18, 104-105).

20 Des portions élargies (1706) peuvent aussi recevoir des microséparateurs passifs ou actifs pourvus de billes magnétiques (Cf Ahn CH, Trimmer W, Jun YN, Erramilli S. A fully integrated micromachined magnetic particle separator. Journal of Microelectromechanical Systems, 1996, vol 5, N° 3, 151-158). Lesdites portions élargies (1706) pour billes magnétiques peuvent être encadrées par des logements (1767) pour électro-aimants (1768),

- 30 La Figure 4B montre en perspective le même module élémentaires plat (1) que la Figure 4A. Dans cette vue en perspective apparaît la ligne (2119) de micro-puits (42) dans l'épaisseur et sur la tranche dudit module élémentaire plat (1).

La Figure 4C montre en perspective le micro-array (3119) formé par empilement des

35 modules élémentaires plats (1) dont les microcanaux (41) sont pourvus de micromélangeurs (19), de portions élargies (1701) pourvues de micro-colonnes, de portions élargies (1706) recevant des billes magnétiques et encadrées par des logements (1767) pour électro-aimants (1768), lesdits électro-aimants (1768) traversant de part en part transversalement ledit micro-array ou macro-array multibloc (3119). Lorsque ledit électro-aimant (1768) est activé, les

micro-particules magnétiques sont séparées du surnageant dans lesdites portion élargies (1706) proches dudit électro-aimant (1768).

5 Selon l'invention, ainsi que le montrent les Figures 5, 6, 7, 8, 9, un micro-array ou un macro-array multibloc (319) est alimenté par le dessous en réactifs ou en échantillons avec une compacité, une intégration et une architecture parallèle optimisées lorsque tous les modules élémentaires plats (110), qui le constituent par empilement comportent une circuiterie micro-fluidique (55) pourvue d'orifices d'alimentation et d'évacuation en échantillons et réactifs
10 d'alimentation sont tels que (8), (10), (12), à titre d'exemple. Ces orifices d'évacuation sont tels que l'orifice (11), à titre d'exemple.

Selon l'invention, , ainsi que le montrent les Figures 5, 6, 7, 8, 9, lesdits modules élémentaires plats (110) peuvent être constitués de deux parties (145) et (155), ladite partie
15 (145) supportant tout ou partie des microcanaux (41) et pouvant être éventuellement détachables et de très faible épaisseur, de l'ordre de 20 à 800 microns et ladite partie (155) supportant tout ou partie des composants de plus grande section.

La Figure 5 montre une vue de dessus dudit micro-array ou macro-array multibloc (319) de
20 l'invention constitué par l'empilement desdits modules élémentaires plats (110), chacun desdits modules élémentaires plats apportant une ligne (219) dudit micro-array ou macro-array multibloc (319). La Figure 5 montre aussi à titre d'exemple les orifices d'alimentation en réactifs (10) situés dans l'épaisseur et sur la tranche d'un côté desdits modules élémentaires plats (110), et des orifice d'alimentation en réactifs (12) situés dans l'épaisseur et sur la
25 tranche d'un autre côté desdits modules élémentaires plats (110).

La Figure 6 montre une vue de face dudit module élémentaire plat (110) de l'invention pourvue d'une circuiterie microfluidique (55) pouvant alimenter lesdits micro-canaux (41) et finalement ledit micro-array ou macro-array multibloc (319). Ladite circuiterie
30 microfluidique pouvant comprendre une zone de filtration (25) avec filtres (16), une zone de purification (35) avec microcolonne (17), et une zone de préparation (45) du produit filtré et purifié avant son introduction pour faible partie dans lesdits micro-canaux (41) et finalement, par voie interne, par le dessous, à l'abri de toute évaporation et de toute contamination, dans les micro-puits (42) d'une ligne (219) dudit micro-array ou macro-array multibloc (319).

35 La Figure 7 montre une vue de dos dudit module élémentaire plat (110) de l'invention pourvu de circuiteries électriques (381) et (391) destinée à activer les électrodes et composants dont sont pourvus lesdits modules élémentaires plats (110) pour commander le mouvement des fluides.

La Figure 8 montre une vue de dessous dudit micro-array ou macro-array multibloc (319) de l'invention avec des orifices d'alimentation en réactifs ou en échantillons tels que, à titre d'exemple, (7) et (8), et des orifices d'évacuation tels que, à titre d'exemple, (11). Selon l'invention, lesdits orifices sont situés dans l'épaisseur et sur la tranche desdits modules élémentaires plats (110).

La Figure 9 montre une vue de profil dudit micro-array ou macro-array multibloc (319) de l'invention. La Figure 9 montre également des plots de connexion électrique (380) et (390) situés, selon l'invention, dans l'épaisseur et sur la tranche desdits modules élémentaires plats (110).

Les Figures 5, 6, et 7 et 9 montrent les encoches (71) et (72) dont sont éventuellement pourvus les parties (155) desdits modules élémentaires plats (110) pour recevoir des guides d'alignement tels que (61), (62). Elles montrent aussi les encoches (74) dont sont éventuellement pourvues lesdites parties détachables (145) desdits modules élémentaires plats (110) pour recevoir leur propre guide d'alignement au cas où elles seraient détachées et empilées séparément.

Selon l'invention, la précision de l'empilement peut aussi être assurée par des contenants qui épousent les contours de la forme d'un micro-array ou macro-array multibloc de l'invention.

Les Figures 10, 11, 12, 13, 14 montrent comment lesdites parties détachables (145) desdits modules élémentaires plats (110) peuvent être détachées et être empilées pour former un micro-array ou macro-array multibloc (318) de plus grande densité que ledit micro-array ou macro-array multibloc (319).

La Figure 10 représente le détachement desdites parties détachables (145), vu de profil, et les Figures 11 et 12 représentent ce détachement vu de dessus.

La Figure 13 et la Figure 14 représentent, respectivement en vue de profil et vue de dessus, un micro-array ou macro-array multibloc (318) formé par empilement desdites parties détachables (145). Ledit micro-array ou macro-array multibloc (318) est de plus grande densité que ledit micro-array ou macro-array multibloc (319).

Selon l'invention, les micro-array ou macro-array multibloc de plus grande densité (318) constitués par l'empilement desdites parties détachables (145) peuvent se connecter entre eux face à face, ainsi que le montre la Figure 15 et la Figure 16.

Les Figure 15 et Figure 16 représentent respectivement en vue de profil et vue de face la connexion face à face d'un premier micro-array ou macro-array multibloc (2318) constitué par empilement de parties détachables (2145) de modules élémentaires plats avec un deuxième micro-array ou macro-array multibloc (1318) constitué par empilement de parties détachables (1145).

Selon l'invention, un microarray ou macro-array multibloc (3119) peut se connecter à un autre micro-array ou macro-array multibloc (3119) de façon orthogonale, dès lors que que l'empilement de modules plats élémentaires (1) constituant le premier micro-array ou macro-array multibloc (3119) est décalé par une rotation de 90° autour de l'axe des micro-canaux (41) par rapport à l'empilement des modules élémentaires plats (1) du deuxième micro-array ou macro-array multibloc (3119), de manière à offrir la possibilité d'un parallélisme massif des réactions par configuration de matrices XY où des lignes de premiers réactifs (x_1 x_2 .. x_n) dans le premier micro-array ou macro-array multibloc (3119) se croisent avec des lignes de deuxièmes réactifs (y_1 y_2 ... y_n) dans le deuxième micro-array ou macro-array multibloc (3119).

Les Figures 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 représentent comment plusieurs micro-arrays ou macro-arrays multiblocs de l'invention peuvent se connecter face à face, avant ou après que lesdites parties détachables desdits modules élémentaires plats soient détachées.

La Figure 17 et la Figure 18 représentent comment un empilement de modules élémentaires plats (910) pourvus d'un seul compartiment (956) avec un orifice d'introduction (907) peut se connecter directement à un empilement des modules élémentaires plats (94610) pourvus de micro-canaux (94641) avec micro-mélangeurs (94619), lesdits micro-canaux (94641) débouchant dans l'épaisseur et sur la tranche desdits modules élémentaires plats (94610), ledit empilement desdits modules élémentaires plats (94610) pouvant se connecter orthogonalement à un empilement de modules élémentaires plats (25110) constituant ledit micro-array ou macro-array multibloc de l'invention, ladite connexion se pouvant se faire avant ou après le détachement des parties détachables (25145) desdits modules élémentaires plats (25110)..

La Figure 19 et la Figure 20 représentent comment un empilement de modules élémentaires plats (9010) pourvu de plusieurs compartiments (9056) avec orifice d'introduction (9007) peut se connecter directement à un empilement des modules élémentaires plats (9046) pourvus de micro-canaux (9041) avec micro-mélangeurs (9019), lesdits micro-canaux (9041) débouchant dans l'épaisseur et sur la tranche desdits modules élémentaires plats (9046), ledit empilement desdits modules élémentaires plats (9046) pouvant se connecter orthogonalement à un empilement de modules élémentaires plats (25110) constituant ledit micro-array ou

macro-array multibloc de l'invention, ladite connexion se faisant avant ou après le détachement des parties détachables (25145) desdits modules élémentaires plats (25110).

5 La Figure 21 et la Figure 22 représentent comment un empilement de modules élémentaires plats (1010) pourvu d'un seul compartiment (1056) avec orifice d'introduction (1007) peut se connecter orthogonalement à un empilement des modules élémentaires plats (104610), ledit empilement desdits modules élémentaires plats (104610) pouvant se connecter directement à un empilement de modules élémentaires plats (25110) constituant ledit micro-array ou
10 macro-array multibloc de l'invention, ladite connexion se faisant avant ou après le détachement des parties détachables (25145) desdits modules élémentaires plats (25110).

La Figure 23 et la Figure 24 représentent comment plusieurs empilement juxtaposés de modules élémentaires plats (10010) pourvus de plusieurs compartiments (10056) avec orifice d'introduction (10007) peuvent se connecter orthogonalement à un empilement des modules
15 élémentaires plats (1004610), ledit empilement desdits modules élémentaires plats (1004610) pouvant se connecter directement à un empilement de modules élémentaires plats (25110) constituant ledit micro-array ou macro-array multibloc de l'invention, ladite connexion se faisant avant ou après le détachement des parties détachables (25145) desdits modules élémentaires plats (25110).

20 La Figure 25 A, la Figure 25 B, la Figure 25 C montre comment s'obtient une densité maximale des micro-arrays multiblocs de l'invention.

En effet, la Figure 25 A, montre un micro-array (4319) constitué par empilement de modules élémentaires plats (4110) pourvus de deux sous- parties (4145) et (4155).

25 Les micro-canaux (41) débouchent sur le micro-array (4319) dans l'épaisseur et sur la tranche desdites sous-parties (4145).

La portion desdits micro-canaux (41) sur ladite sous-partie (4155) est pourvue de micro-mélangeurs (4019), lesdits micro-canaux (41) reprenant une très petite partie des fluides amenés par la micro-circuiterie (4055).

30 Ladite sous-partie (4155) ménage un espace important entre lesdits micro-canaux (41) et ladite sous-partie (4145) reçoit lesdits micro-canaux (41) dans une configuration resserrée, de manière que l'empilement desdits modules élémentaires plats (4110) constitue des micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (4319) de forte densité.

35 La Figure 25 B et la Figure 25 C montrent qu'après détachement, l'empilement desdites sous-parties (4145) constitue des micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (4318) dont le niveau encore supérieur de densité par rapport au micro-array (4319) est dû à la moindre épaisseur desdites sous-parties détachables (4145).

La Figure 26 A, la Figure 26B et la Figure 26C montrent qu'on peut choisir de ne pas détacher les sous parties (4145) de modules élémentaires plats (4110) formant par empilement un micro-array ou un macro-array multibloc (4319) de l'invention, mais plutôt de créer un micro-array ou un macro-array multibloc équivalent (20317), puis un micro-array ou un macro-array multibloc (20316) de plus grande densité.

En effet, la Figure 26 A et la Figure 26B montrent des modules élémentaires plats (20046) traversés longitudinalement de part en part par des micro-canaux débouchant dans l'épaisseur et sur la tranche de deux de leurs côtés, lesdits côtés étant opposés, ce qui a pour conséquence qu'un empilement desdits modules élémentaires plats (20046) forme deux micro-arrays ou macro-arrays multiblocs, chacun desdits microarrays ou macro-arrays multiblocs se constituant sur une face opposée de l'empilement, lesdits modules élémentaires plats (20046) pouvant dès lors être utilisés pour reproduire à l'identique par transfert de réactifs ledit micro-array ou macro-array (4319).

Ainsi l'empilement desdits modules élémentaires plats (20046) peut former le micro-array ou macro-array multibloc (20317) puis le microarray (20316) équivalent à celui qui aurait été constitué en détachant puis en empilant les parties (4145) desdits modules élémentaires plats (4110) dudit micro-array ou macro-array multibloc (4319).

Selon l'invention, ces "micro-arrays ou macro-arrays multiblocs équivalents" permettent de travailler à la fois en parallèle, en utilisant un micro-array ou macro-array multibloc (4319) avec de nombreux micro-puits (42), mais aussi en série en faisant se succéder des analyses différentes à partir d'une même préparation intégrée sur ledit micro-array ou macro-array multibloc (4319), ladite préparation intégrée étant transférée dans plusieurs micro-arrays ou macro-arrays équivalents (20317) successifs. De même, ces configurations utilisant des "micro-arrays ou macro-arrays multiblocs équivalents" sont adaptées à des process d'analyse ou de synthèse chimique, biochimique ou biologique en série.

La Figure 27 montre qu'un micro-array multibloc de haute à très haute densité peut aussi être directement constitué s'il est fait par empilement de modules élémentaires plats qui, d'une part sont de très faible épaisseur, d'autre part ont une configuration qui autorise leurs micro-canaux à resserrer sur lesdits module élémentaire plat.

La Figure 27 montre un micro-array ou macro-array multibloc de haute densité (5319) formé par empilement de modules élémentaires plats (5110) de très faible épaisseur constitué de deux parties (5145) et (5155) avec plots d'alignement (71).

Les micro-canaux (41) débouchent sur le micro-array multibloc (5319) dans l'épaisseur et sur la tranche desdites sous-parties (5145).

La portion desdits micro-canaux (41) sur ladite sous-partie (5155) est pourvue de micro-mélangeurs (5019), lesdits micro-canaux (41) reprenant une très petite partie des fluides amenés par la micro-circuiterie (5055).

Ladite sous-partie (5155) ménage un espace important entre lesdits micro-canaux (41) et ladite sous-partie (5145) reçoit lesdits micro-canaux (41) dans une configuration resserrée, de manière que l'empilement desdits modules élémentaires plats (5110) constitue directement des micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (5319) de très haute densité.

5

La Figure 28A, la Figure 28B, la Figure 28 C, la Figure 28D montrent comment une pièce intermédiaire transversale (30339) pourvue de micro-canaux peut être connectée entre un empilement de modules élémentaires plats (21110) et un empilement de modules élémentaires plats (5110).

10 Dans l'exemple relaté sur les Figures 28A, 28B, 28C, 28D, lesdits modules élémentaires plats (21110) sont traversés longitudinalement de part en part par des micro-canaux débouchant dans l'épaisseur et sur la tranche de deux de leurs côtés, lesdits côtés étant opposés, chacun desdits microarrays ou macro-arrays multiblocs se constituant sur une face opposée de l'empilement, ledit empilement étant orthogonal par rapport à l'empilement des modules

15

élémentaires plats (5110).
La dite pièce intermédiaire (30339) peut être fabriquée selon le mode des micro-arrays ou macro-arrays multiblocs de l'invention, c'est à dire par empilement de modules élémentaires plats, ledit empilement étant parallèle aux micro-canaux, ou bien selon un mode différent, par exemple avec des micro-canaux orientés perpendiculairement à l'empilement de modules

20 élémentaires plats, c'est à dire perpendiculairement à une surface plane et non pas parallèlement à la longueur ou à la largeur de la surface plane comme pour l'invention.
Selon l'invention, un tel type de pièce intermédiaire (30339) peut être utilisée comme simple connecteur, ou comme pièce utile au process d'analyse ou de synthèse chimique, biochimique ou biologique, par exemple en étant pourvus de molécules fixées et utiles au process, ou en

25 étant pourvue de micro-particules ou micro-sphères fixant des molécules utiles au process, ou bien en étant pourvues de micro-réservoirs de réactifs en dérivation des micro-canaux, ou bien en étant pourvues de micro-composants tels que micro-colonnes, microfiltres, micro-mélangeurs, micropompes, microvannes, micro-réchauffeurs, etc.

La Figure 29A montre en perspective un micro-array ou macro-array multibloc (6319) de l'invention formé par empilement de modules élémentaires plats (6110). Lesdits modules élémentaires plats (6110) sont formés de sous-parties (6155) et de sous-parties (6145). Lesdites sous-parties (6145) sont pourvues de micro-canaux (41) débouchant dans leur épaisseur et sur leur tranche pour former les micro-puits (42) dudit micro-array ou macro-array multibloc (6319). Lesdits micro-canaux (41) sont pourvus de micro-mélangeurs (19).

30 Lesdites sous-parties (6145) sont également pourvues de plots de connexion électrique (390) situés dans leur épaisseur et sur leur tranche.

35

Selon l'invention, les dites sous-parties (6155) sont pourvues d'un orifice d'évacuation (11) et d'orifices d'introduction (7), (8), (10), (12) situés dans l'épaisseur et sur la tranche desdits modules élémentaires plats (6110), de microfiltres (16), et d'une microcolonne (17).

Selon l'invention, ladite micro-colonne (17), comme d'autres micro-composants du système microfluidique, peut être isolée par des obturateurs (9) et (14) situés dans l'épaisseur et sur la tranche desdits modules élémentaires plats (6110) et actionnés par l'extérieur desdits modules élémentaires plats (6110)

- 5 La Figure 29B montre une vue de face d'un module élémentaire plat (6110) dudit micro-array ou macro-array multibloc (6319) de l'invention .

- La Figure 30A et la Figure 30 B montrent respectivement en perspective et de face, ledit micro-array ou macro-array multibloc (6319) où apparaît le parallélisme des opérations, avec, à titre d'exemple, un circuit de lavage (66) pendant la préparation, avant que des produits purifiés (67) retenus sur la microcolonne (17) soient envoyés en surface dudit micro-array ou macro-array multibloc (6319). Dans cet exemple, alors que les orifices d'introduction sont bouchés par des bouchons (351), (352), (353), et alors que ladite microcolonne (17) est isolée par le double obturateur (354), un produit de lavage introduit par l'orifice (10) est évacué par l'orifice (11) dans tous lesdits modules élémentaires (6110) en même temps, de sorte qu'une opération de préparation de réactifs ou d'échantillons a lieu en même temps pour tous lesdits micro-puits (42) desdits micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (6319).
- 10
- 15

- La Figure 31 montre le parallélisme des opérations sur une vue en perspective d'un micro-array ou macro-array multibloc (7319) de micro-puits (42) formé par empilement de modules élémentaires plats (7110) pourvus d'une zone de lyse-filtration (7025), d'une zone de purification (7035) munie d'une micro-colonne (7017), d'une zone de préparation des réactifs purifiés (7045). A titre d'exemple, il est représenté l'envoi d'un mélange réactionnel (79) en surface dudit micro-array ou macro-array multibloc (7319), via les micro-canaux (41), ledit mélange réactionnel représentant le produit purifié (77) additionné d'un tampon (78) .
- 20
- 25

- La Figure 32 montre une connexion d'un un bloc multi-pipette (70211) avec micro-array ou macro-array multibloc de l'invention. Ledit micro-array ou macro-array multibloc de l'invention est formé par empilement de modules élémentaires plats (70110) avec sous-parties (70155) et (70145) . Lesdites sous-parties (70155) sont pourvues d'une circuiterie microfluidique (70055), et lesdites sous parties (70145) sont pourvues de microcanaux (41) débouchant dans leur épaisseur et sur leur tranche. Ledit bloc multipipette (70211) intègre un empilement de modules élémentaires plats (70110) pourvus de sous -parties (70202) et de sous-parties (70245).
- 30

35

La Figure 33A montre en perspective comment un micro-array ou macro-array multibloc de l'invention formé par empilement de modules élémentaires plats mâles (8110) est connecté à une pièce monobloc d'aplanissement de surface (555).

La Figure 33B en coupe la connexion du micro-array ou macro-array multibloc avec ladite pièce monobloc d'aplanissement de surface (555).

Les Figures 33 A et la Figure 33 B montrent une pièce monobloc (555) d'aplanissement de microarrays ou macro-arrays multiblocs constitué par un empilement de modules
5 élémentaires plats 8110 mâles. Ladite pièce d'aplanissement (555) est monobloc, présente au recto une face plane, et présente au verso son autre face qui s'emboîte dans les creux ménagés entre les parties saillantes desdits modules élémentaires plats 8110 mâles .
Cette pièce est utilisable dans tous les cas où un micro-array ou macro-array multibloc de
10 l'invention doit présenter une surface plane, par exemple dans les cas où l'on doit éviter des réflexions lumineuses pour des détecteurs ou des photo-expositions.

La Figure 42 montre la connexion orthogonale d'un élément plat de préparation des échantillons et réactifs (27110) avec un élément plat (27210) apportant un réactif spécifique
15 dans un des micro-puits dudit élément plat de préparation des échantillons et réactifs (27110).

La Figure 43 montre la connexion orthogonale d'un empilement d'éléments plats de préparation des échantillons et réactifs (27110) avec un empilement d'éléments plats
20 (27210) apportant un réactif spécifique dans chacun des micro-puits desdits éléments plats de préparation des échantillons et réactifs (27210).

La Figure 44 montre la connexion orthogonale d'un élément plat, en deux parties assemblables, de préparation des échantillons et réactifs, avec un élément plat, en deux
25 parties assemblables lui aussi, et apportant un réactif spécifique dans un des micro-puits dudit élément plat de préparation des échantillons et réactifs.

La Figure 45 montre la connexion orthogonale d'un empilement d'éléments plats , en deux parties assemblables, de préparation des échantillons et réactifs avec un empilement
30 d'éléments plats, en deux parties assemblables eux aussi, et apportant un réactif spécifique dans chacun des micro-puits desdits éléments plats de préparation des échantillons et réactifs.

La Figure 46 montre un élément plat de préparation des échantillons et réactifs (47000) capable de diriger une ligne de premiers aliquots de ladite préparation vers une ligne de macro-emplacements (47107) et capable de se connecter à un empilement de modules plats (37110) pourvus chacun d'une chambre de réception (37164). Les modules plats (37110) sont eux capables de reprendre par une ligne d'orifices (37107) chaque aliquot dudit module

plat (47000) dans ladite chambre de réception des aliquots (37164) pour l'aliquoter à nouveau sur des micro-puits ou de micro-emplacements (37042) par le biais de microcanaux (37041) traversant des micromélangeurs (47019).

- 5 La Figure 47 montre la connexion d'un élément plat de préparation des échantillons et réactifs (47000) avec un empilement de modules plats (37110) capables de reprendre chaque aliquot dudit module plat (47000) pour l'aliquoter à nouveau sur un micro-array des micro-puits ou de micro-emplacements (37042).
- 10 La Figure 48 montre le face à face entre une première ligne, au premier plan, de n empilements horizontaux de p modules plats identifiés individuellement de manière spécifique, avec une deuxième ligne, en arrière plan, de n empilements verticaux de p modules plats de réactifs spécifiques.
- Le marquage individuel servira plus tard à rassembler des modules avec le même marquage
- 15 pour constituer un micro-array ou macro-array multibloc de l'invention dédié à un échantillon correspondant à ce marquage, ledit micro-array ou macro-array multibloc recevant np réactifs spécifiques dans chacun de ses micro-emplacements ou micro-puits.
- La Figure 49 montre la connexion orthogonale entre une première ligne, au premier plan, de
- 20 n empilements horizontaux de p modules plats identifiés individuellement de manière spécifique, avec une deuxième ligne, en arrière plan, de n empilements verticaux de p modules plats de réactifs spécifiques, donnant lieu à n micro-arrays de np micro-puits, soit en tout $n^2 p$ micropuits, chacun des $n^2 p$ micro-puits ayant reçu l'un des np réactifs spécifiques
- 25 La Figure 50 montre la redistribution des modules plats des n empilements précédents de modules plats marqués différemment dans n nouveaux empilements regroupant les modules plats avec le même marquage individuel, chacun desdits empilement avec le même marquage individuel étant dédié à un seul échantillon.
- 30 La Figure 51 et la Figure 52 montrent la connexion de n modules plats chacun à un seul échantillon avec n nouveaux empilements regroupant les modules plats avec le même marquage individuel, chacun des n échantillons pouvant rencontrer np réactifs spécifiques, les n empilements donnant lieu à n micro-arrays représentant au total $n^2 p$ micro-puits.
- 35 La Figure 54A, la Figure 54B, la Figure 54C, la Figure 54D montrent une pièce monobloc de fixation et de synthèse en phase solide de molécules (339) plane, monobloc, connectable à un micro-array ou un macro-array multibloc de l'invention, pourvue d'un array de micro-puits dont le quadrillage est calqué sur celui dudit micro-array ou macro-array multibloc de l'invention. Ladite pièce monobloc de fixation et de synthèse en phase solide de molécules

(339) offre dans chacun de ses micro-puits une surface de fixation à une molécule à synthétiser dans un process de synthèse en phase solide, ou une surface de réception de microparticules fixant la première molécule d'une chaîne moléculaire à synthétiser. L'exemple sur les Figures 54 A, 54B, 54C, et 54D montre qu'on peut synthétiser in situ dans
5 les micro-puits de ladite pièce (339) des octamers à partir de tetramers préfixés et de tétramers amenés par les microcanaux (41) desdits micro-arrays ou macro-arrays multiblocs de l'invention.

Les Figures 55A, 55B, 55C, 55D montrent qu'on peut synthétiser in situ dans les micro-puits
10 (42) d'un micro-array ou macro-array multibloc (319) des octamers à partir de tetramers préfixés dans lesdits micro-puits (42) et de tétramers amenés par les microcanaux (41) desdits micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (319) de l'invention. Ladite synthèse peut éventuellement avoir lieu pendant les phases de fabrication desdits modules élémentaires plats (1) pour fabriquer des dispositifs prêts à l'emploi, ou pendant le process de l'analyse ou
15 de la synthèse.

Selon l'invention, les micro-canaux (41) desdits modules élémentaires plats (1) peuvent être pourvus de portions élargies et destinées à fixer des molécules actives dans le process d'analyse ou de synthèse auquel sont dédiés lesdits modules élémentaires plats (1), ladite
20 fixation de molécules actives pouvant avoir lieu pendant les phases de fabrication desdits modules élémentaires plats (1) pour fabriquer des dispositifs prêts à l'emploi, ou pendant le process de l'analyse ou de la synthèse. L'exemple précis des Figures 56 A, 56 B, 56C, 56D montre qu'on peut synthétiser in situ dans des portions élargies des micro-canaux (41) d'un micro-array ou macro-array multibloc (319) des octamers à partir de tetramers préfixés et de
25 tétramers amenés par lesdits microcanaux (41) desdits micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (319) de l'invention.

Selon l'invention, lesdites portions élargies desdits microcanaux (41) desdits modules élémentaires plats (1) peuvent aussi être destinées à recevoir des microparticules magnétiques
30 ou passives de fixation de molécules pendant les phases de fabrication pour fabriquer des dispositifs prêts à l'emploi, ou pendant le process de l'analyse ou de la synthèse. Ladite fixation de molécules peut avoir lieu pendant les phases de fabrication desdits modules élémentaires plats (1) pour fabriquer des dispositifs prêts à l'emploi, ou pendant le process de l'analyse ou de la synthèse

35 Selon l'invention, on peut connecter à un micro-array ou un macro-array multibloc (3119) une pièce recevant des dépôts de microparticules, plane, monobloc, pourvue d'un array de micro-puits dont le quadrillage est calqué sur celui dudit micro-array ou macro-array multibloc (3119), offrant dans chacun de ses micro-puits une surface de dépôt à desdites

microparticules pourvues de bras moléculaires de liaison, ce qui permet de fabriquer un micro-array ou un macro-array de microparticules utilisable en analyse ou en synthèse chimique ou biochimique. Une modalité est représentée par une application du brevet

5 "WO9740385A1 - Light-controlled electrokinetic assembly of microparticules near surfaces", où, sur un substrat en silicium, les micropuits sont adressés par des électrodes en oxyde de silicium et baignés par une solution électrolyte, et où lesdites microparticules peuvent être assemblées sous le contrôle de la lumière

Selon l'invention, lesdites portions élargies desdits microcanaux (41) desdits modules élémentaires plats (1) peuvent aussi être destinées à être photoexposées, de manière à pouvoir
10 procéder à des synthèses avec utilisation de groupements photolabiles au lieu même desdites portions desdits microcanaux (41), lesdites synthèses ayant pour but de produire des composés à la demande, ou pour but de fabriquer un dispositif d'analyse prêt à l'emploi pourvu de molécules synthétisées in situ.

Les Figures 57A, 57B, 57C montrent qu'on peut synthétiser in situ des biopuces dans chaque
15 micro-puits d'une pièce monobloc de fixation et de synthèse en phase solide de molécules (338), en utilisant des groupements photolabiles et des micro-arrays ou macro-arrays de micromasques (187) de photolithographie. Ladite pièce monobloc de fixation et de synthèse en phase solide de molécules (338) est plane, monobloc, connectable à un micro-array ou un macro-array multibloc (3119), pourvue d'un array de micro-puits ou de spots dont le
20 quadrillage est calqué sur celui dudit micro-array ou macro-array multibloc (3119).

L'utilisation conjointe des groupements photolabiles et des masques de photolithographie, permet de fabriquer un micro-array ou un macro-array de biopuces ayant pour support ladite pièce (338). L'utilisation conjointe de groupements photolabiles et de micro-miroirs digitaux permet aussi de fabriquer un micro-array ou un macro-array de biopuces ayant pour support
25 ladite pièce (338).

Les Figures 58A, 58B, 58C montrent qu'on peut synthétiser in situ des biopuces dans chaque micro-puits (42) d'un micro-array ou macro-array multibloc (319) de l'invention. L'utilisation conjointe des groupements photolabiles et des masques de photolithographie, permet de fabriquer un micro-array ou un macro-array de biopuces ayant pour support ledit micro-array
30 ou macro-array multibloc (319). L'utilisation conjointe de groupements photolabiles et de micro-miroirs digitaux permet aussi de fabriquer un micro-array ou un macro-array de biopuces ayant pour support ledit micro-array ou macro-array multibloc (319) de l'invention.

La Figure 59A montre comment un micro-array ou micro-array multibloc de l'invention
35 formé par empilement de modules élémentaires plats (1) peut être connecté à deux pièces (340) monobloc et planes, chacune formant un micro-array monobloc de bouchons.

La Figure 59B montre comment un premier micro-array ou micro-array multibloc de l'invention formé par empilement de modules élémentaires plats (1) peut être connecté à un autre micro-array de l'invention formé par empilement de modules élémentaires plats (1101)

dont les micro-canaux sont pourvus de micro-vannes (396). Dans cette configuration, un micro-puits dudit premier micro-array ou micro-array multibloc de l'invention isole un volume compris entre l'orifice du micro-canal à la surface dudit premier micro-array ou macro-array multibloc de l'invention et la dite microvanne sur le micro-array ou macro-array multibloc connecté.

La Figure 59C montre comment un premier micro-array ou micro-array multibloc de l'invention formé par empilement de modules élémentaires plats (1) peut être connecté à un autre micro-array ou macro-array multibloc de l'invention formé par empilement de modules élémentaires plats (1102) pourvus de dispositifs (398) qui créent une force électro-osmotique en établissant un potentiel électrique entre deux endroits des micro-canaux desdits de modules élémentaires plats (1102). Dans cette configuration, un micro-puits dudit premier micro-array ou micro-array multibloc de l'invention isole un volume compris entre l'orifice du micro-canal à la surface dudit premier micro-array ou macro-array multibloc de l'invention et ledit dispositif (398).

La Figure 59D montre comment un premier micro-array ou micro-array multibloc de l'invention formé par empilement de modules élémentaires plats (1) peut être connecté à un autre micro-array de l'invention formé par empilement de modules élémentaires plats (1103) dont les micro-canaux sont pourvus de deux micro-vannes (397). Dans cette configuration, un micro-puits dudit premier micro-array ou micro-array multibloc de l'invention isole un volume compris entre l'orifice du micro-canal à la surface dudit premier micro-array ou macro-array multibloc de l'invention et la première microvanne (397) sur le micro-array ou macro-array multibloc connecté. Un autre volume est isolé entre les deux microvannes (397) dudit deuxième micro-array ou macro-array multibloc de l'invention. La Figure 59 D montre aussi qu'en amont d'un volume isolé entre deux volumes isolés par deux microvannes, il peut être envisagé l'utilisation d'un bloc micropompe (399) commun à plusieurs canaux.

La Figure 34, la Figure 35, la Figure 36 A, la Figure 36B, la Figure 36C, la Figure 37 A, la Figure 37B, la Figure 37C, la Figure 37 D, la Figure 38, la Figure 39 montrent une méthode de fabrication de tous les modules élémentaires plats de l'invention dans laquelle tout type desdits modules élémentaires plats de l'invention, micro-composants non compris, est fabriqué avec les techniques de microfabrication selon un assemblage par superposition et fusion de sous-parties planes complémentaires.

La Figure 34 et la Figure 35 montrent en perspective comment un module élémentaire plat (6110) devant être pourvu de micro-canaux (41), de micromélangeurs (19), d'une circuiterie micro-fluidique (55), de logements pour micro-filtres (16), de logements pour micro-colonnes (17), d'orifices (7) et (11) pour échantillons et réactifs, peut-être micro-fabriquée par

l'assemblage de deux hémi-modules élémentaires plats (611012), chacun de ses deux hémi-modules élémentaires plats (611012) ayant été micro-usiné ou micro-moulé ou micro-estampé pour que soient formés, entre autres, une hémi-circuiterie micro-fluidique (5512), des hémi-microcanaux (4112) débouchant sur la tranche desdits hémi-modules élémentaires plats (611012) par les hémi-micro-puits (4212), des hémi-micromélangeurs (1912), des hémi-logements (1612) pour micro-filtres (16), des hémi-logements (1712) pour micro-colonnes (17), des hémi-orifices (712) et (1112) pour échantillons et réactifs .

La Figure 36 A et la Figure 36B montrent comment un module élémentaire plat peut-être fabriqué par l'assemblage d'au moins une sous-partie plane inférieure (2) et une sous partie plane supérieure (3), ladite sous partie plane supérieure (3) faisant office de couvercle.

La Figure 36 C montre le micro-array multibloc (319) ainsi fabriqué.

La Figure 37A montre une sous-partie d'un module élémentaire plat, la Figure 37B montre l'assemblage d'une sous-partie d'un module élémentaire plat avec sa partie complémentaire, la Figure 37C montre un micro-array ou macro-array multibloc constitué de l'empilement desdits modules élémentaires plats fabriqués par assemblage desdites parties complémentaires, la Figure 37 D représente par transparence le micro-array ou macro-array ainsi constitué.

La Figure 38 montre que lorsque des modules élémentaires plats (18110) ne présentent pas de composants, le support plat qui sert à fabriquer l'une de ses sous-parties complémentaires (1811012) muni de ses hémi-micro-mélangeurs (1801912) peut être très mince, ce qui permet de constituer directement un micro-array ou un macro-array multibloc (18319) de densité élevée.

La Figure 39 montre que lorsque des modules élémentaires plats (19110) présentent des composants activés par une circuiterie électrique (391) avec des plots de connexion (390), le support plat d'une de ses sous-parties complémentaires (1911012) doit réserver des logements tels que 393, et 394 pour composants tels que micro-vannes, capteurs, micro-réchauffeurs, ce qui limite la densité du micro-array ou un macro-array multibloc (19319) pouvant être constitué.

Selon l'invention, à l'usine de fabrication, les étapes de fabrication de tout type desdits modules élémentaires plats de l'invention peuvent être mises à profit pour fabriquer des systèmes prêts à l'emploi de synthèse ou d'analyse chimique, biochimique ou biologique, par exemple par constitution de micro-réservoirs de réactifs.

Selon l'invention, les surfaces desdits micro-arrays ou macro-arrays multiblocs sont micro-usinées ou soumises à un travail de finition avec les mêmes techniques de microfabrication que s'il s'agissait d'une surface plane d'un seul tenant, c'est à dire essentiellement des

techniques de découpage, de gravure sèche ou gravure humide par photolithographie, d'ablation laser, d'assemblage ou collage par fusion ou d'assemblage anodique, de forage, d'estampage, de soudure, d'électrodéposition, d'electroless plating ou de dépôt de vapeur chimique.

5

Selon un version de l'invention, on peut utiliser pour l'analyse chimique, biochimique, et biologique, des empilements décalés de modules élémentaires plats dont un côté au moins a une forme en arc de cercle, lesdits modules élémentaires plats étant pourvus de micro-canaux débouchant dans l'épaisseur et sur la tranche dudit côté en arc de cercle. L'empilement ainsi
10 constitué est adapté à une connexion avec des éléments homologues pour une détection par détecteur rotatif. Un exemple de ce type de détecteur rotatif est décrit pour la détection après micro-électrophorèse dans le brevet " Rotating scanning apparatus WO 96/13716".

La configuration desdits modules élémentaires plats desdits micro-arrays ou macro-arrays
15 multiblocs de l'invention peut être adaptée au type de détection (micro-électrophorèse, hybridation, spectrométrie de masse, chromatographie, micro-électrochromatographie, caméras CCD, fibres optiques, microscopie confocale, détection avec fluorescence, chimiluminescence, bioluminescence, colorimétrie, par surface plasmon resonance, par
20 mesure de l'onde évanescence, par électrochimie, par radioactivité, par spectroscopie Raman, etc) en adéquation avec le but de l'analyse.

APPLICATION AUX MICRO-ARRAYS OU MACRO-ARRAYS DE L'INVENTION DEDIES A L'ANALYSE DE L'ADN:

25

Pour des micro-arrays ou macro-arrays dédiés à l'analyse d'ADN, ladite préparation intégrée comprend la lyse cellulaire, la filtration des débris, l'extraction et la purification sur matrices de silice, puis l'amplification avec une des nombreuses méthodes bien connues de l'Homme de l'Art, telles que, parmi d'autres, la PCR, la RT-PCR, la LCR, la NASBA, la SDA, la TMA,
30 la RCA.

De nombreux protocoles existent pour la lyse cellulaire et l'extraction-purification de l'ADN, selon qu'on a affaire à des prélèvements de sang total, de plasma, de serum, de tissus, de cheveux, de suspension cellulaire, de moelle osseuse, de liquide cérébro-spinal, de
35 prélèvement buccaux, de liquides corporels, de déchets corporels, de biopsies, de biopsies protégées par de la paraffine, de bactéries Gram-positive, de bactéries Gram-Négative, de moisissures, de plantes., de gels d'agarose ou de polyacrylamide, ou bien que l'analyse vise de virus à ARN ou des virus à ADN.

Les procédés d'extraction au phénol-chloroforme et par filtration tendent à laisser la place à des procédés comme la chromatographie par échange d'ions et l'extraction sur matrices de gel de silice.

La chromatographie par échange d'ions sur l'ADN vise à utiliser des surfaces d'adsorption de microparticules ou de supports hydrophiles à haute densité de charges positives et à lier les charges négatives des phosphates des ADN dans des conditions de salinité faibles, qui éliminent les possibilités d'adsorption des protéines et des carbohydrates. Les conditions d'élution de l'ADN adsorbé sont au contraire des conditions de forte salinité. La chromatographie par échange d'anions se termine soit par une précipitation avec un alcool, soit par un dessalement sur micro-particules ou matrices de gels de silice.

L'adsorption sur matrices ou micro-particules de gel de silice vise à adsorber l'ADN lorsque de fortes teneurs en sels chaotropiques lient l'eau libre des solutions aqueuses, tandis que les protéines et les carbohydrates ne s'adsorbent pas. L'élution de l'ADN adsorbé sur matrices ou micro-particules de gel de silice se fait dans des conditions de faible salinité, par exemple à l'eau, et l'ADN purifié est prêt à l'emploi sans nécessité de précipitation.

Lorsqu'on utilise des matrices de gel de silice simples ou des micro-particules sans de gel de silices simples, ladite méthode d'extraction-purification sur matrice de gels de silices nécessite des centrifugations.

Lorsque par contre on utilise des microparticules magnétiques de gel de silice et de fer, on peut se passer de centrifugations.

Les méthodes d'extraction-purification de l'ADN avec chromatographie par échange d'anions ne nécessitent pas de centrifugation, car la gravité suffit. Elles offrent un grand degré de pureté. Elles sont particulièrement utiles dans un protocole d'extraction d'ADN sur Bactéries Gram- Négatives, pour laquelle on peut éviter la précipitation à l'alcool en utilisant en deuxième étape un passage sur micro-particules ou matrice de gel de silice avec centrifugation, ou bien avec micro-particules magnétiques de gel de silice sans centrifugation.

Les méthodes d'extraction d'ADN sur matrices de gel de silice conviennent pour la plupart des prélèvements, excepté pour les Bactéries Gram-Négatives et les plantes où des protocoles utilisant la chromatographie par échange d'anions sont appropriées, dussent-elles constituer une première étape suivie d'une deuxième étape sur micro-particules simples ou magnétiques de gel de silice ou matrices de gel de silice

La Figure 40A représente un mode de réalisation de l'invention et réside dans des micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (13319) dédiés à l'analyse de fragments d'ADN avec une préparation intégrée avec extraction de l'ADN par chromatographie par échanges d'anions puis dessalement sur microparticules magnétiques de gel de silice.

La Figure 40A représente un mode de réalisation de l'invention et réside dans des micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (13319) dédiés à l'analyse de fragments d'ADN avec une préparation intégrée comprenant la lyse cellulaire, la filtration des débris, deux extractions-purifications successives de l'ADN sur deux micro-colonnes de nature différente,
5 l'amplification en amont dudit micro-array ou macro-array multibloc (13319) par une des méthodes connues de l'Homme de l'Art, puis la détection sur ou en aval dudit micro-array ou macro-array multibloc (13319) par une des méthodes connues de l'Homme de l'Art..

Lesdits micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (13319) de micro-puits (42) sont constitués
10 par empilement de modules élémentaires plats (13110), pourvus de deux sous-parties (13155) et (13145).

Ladite sous-partie (13145) comporte les micro-canaux (41) pourvus de micromélangeurs (13019).

Ladite sous-partie (13155) comporte une circuiterie micro-fluidique (13055), composée:
15

- * d'une chambre de lyse cellulaire et de filtration (13015) pourvue de microfiltres (13016), avec orifice d'introduction de l'échantillon (13007), orifice d'introduction des réactifs de lyse (13008), orifice pour obturateur (13009) de passage à la chambre d'extraction-purification-lavage avec chromatographie par échange d'anion (13061)

20

- * d'une chambre d'extraction-purification-lavage avec chromatographie par échange d'anions (13061) pourvue d'une micro-colonne de chromatographie par échange d'anions (13117), avec orifice (13029) pour obturateur permettant d'isoler ladite micro-colonne (13117), orifice d'introduction du réactif d'élution (13113), orifice
25 (13038) d'introduction des réactifs de lavage de ladite micro-colonne (13117), orifice pour évacuation des réactifs de lavage (13011), obturateur (13028) de passage à la chambre (13063) d'extraction-purification-lavage sur micro-particules magnétiques avec fer et gel de silice,

30

- * d'une chambre (13063) pourvue d'un électroaimant (13723), d'un orifice d'introduction des micro-particules de gel de silice (13722), d'un orifice (13010) d'introduction des réactifs de lavage, d'un orifice d'introduction (13726) du réactif activateur d'adsorption de l'ADN auxdites micro-particules magnétiques, d'un orifice d'introduction du réactif d'élution (13013), d'un obturateur (13024) de passage à la chambre de préparation de l'ADN purifié. La Figure 40B montre les microparticules magnétisées par l'électro-aimant (13723) activé dans ladite chambre (13063), et la
35 Figure 40C montre lesdites microparticules magnétiques libres dans ladite chambre (13063).

*d' une chambre de préparation de l'ADN purifié (13064) avec orifice d'introduction (13012) du tampon adéquat pour la méthode d'amplification de l'ADN choisie et donnant accès auxdits micro-canaux (41) de ladite sous partie (13145), ledit tampon étant privé des enzymes, des primers et des dNTP nécessaires à l'amplification

5

Dans ce mode de réalisation de l'invention, l'échantillon d'ADN est introduit dans la chambre de lyse cellulaire et de filtration par ledit orifice (13007). Les réactifs de lyse sont introduits par ledit orifice (13008). Les débris cellulaires de lyse sont filtrés sur les microfiltres (13016), et le lysat est introduit dans la chambre (13061) d'extraction-purification-lavage avec micro-colonne de chromatographie par échange d'anions (13117). Après l'adsorption de l'ADN sur ladite micro-colonne (13117), on procède à l'introduction des réactifs de lavage de ladite micro-colonne (13117) qui sont évacués par l' orifice (13011). Ensuite on isole grâce à un obturateur introduit par l'orifice (13029) ladite micro-colonne (13117), puis on procède à l'élution de l'ADN en introduisant le réactif d'élution par l'orifice (13113). Le retrait des obturateurs (13028) et (13029) permet à l'éluat de passer dans la chambre (13063) d'extraction-purification-lavage sur microparticules magnétiques. Après introduction par l'orifice (13726) d'un tampon adéquat pour la méthode puis du réactif activateur d'adsorption de l'ADN auxdites micro-particules magnétiques, les micro-particules magnétiques sont introduites par l'orifice (13722), puis on procède à un lavage avec des réactifs introduits par l'orifice (13010) et on magnétise avec l'électro-aimant (13723). Après élimination du réactif de lavage par l'orifice (13011), le réactif d'élution est introduit par l'orifice (13013). Après une nouvelle magnétisation, le retrait de l'obturateur (13024) permet le passage à la chambre de préparation de l'ADN purifié (13064), si bien que dans le process l'ADN passe successivement sur la micro-colonne de chromatographie par échange d'anions (13117) à la chambre (13063) de purification sur billes magnétiques avec gel de silice. Dans ladite chambre de préparation de l'ADN purifié (13064), on mélange ledit ADN purifié avec le tampon adéquat pour la méthode d'amplification de l'ADN choisie, ledit tampon étant introduit par l'orifice (13012) et étant privé des enzymes, des primers et des dNTP nécessaires à l'amplification. Ensuite ledit mélange de l'ADN purifié et du tampon d'amplification est introduit dans lesdits micro-canaux (41) avec micro-mélangeurs (13019) de ladite sous partie (13145). Une connexion avec d'autres empilements de modules élémentaires plats permet le mélange de l'ADN avec les réactifs spécifiques ou onéreux de l'amplification souhaitée dans chaque micro-canal (41) et finalement dans chaque micropuits (42), lesdits réactifs spécifiques ou onéreux étant tels qu'enzymes nécessaires à la méthode d'amplification choisie, déoxynucléotides et primers d'amplification. Lesdits réactifs spécifiques ou onéreux peuvent être aussi des primers modifiés adaptés à la méthode de détection choisie, des sondes supplémentaires nécessaires à la méthode d'amplification ou de détection choisie, des déoxynucléotides modifiés, des didéoxynucléotides, des didéoxynucléotides modifiés, des analogues peptidiques de sondes tels que des PNA, etc.

35

La Figure 40B et la Figure 40C montrent l'action d'un électro-aimant sur lesdites micro-particules magnétiques.

- 5 La Figure 41A montre un autre mode de réalisation de l'invention et réside dans des micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (14319) dédiés à l'analyse de fragments d'ADN avec une préparation intégrée avec extraction de l'ADN par chromatographie par échange d'anions puis déssalement sur matrices de gel de silice.
- 10 La Figure 41 A montre des micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (14319) de micro-puits (42) sont constitués par empilement de modules élémentaires plats (14110), pourvus de deux sous-parties (14155) et (14145).
Ladite sous-partie (14145) comporte les micro-canaux (41) pourvus de micromélangeurs (14019).
- 15 Ladite sous-partie (14155) comporte une circuiterie micro-fluidique (14055), composée:
- *d'une chambre de lyse cellulaire et de filtration (14015) pourvue de microfiltres (14016), avec orifice d'introduction de l'échantillon (14007), orifice d'introduction des réactifs de lyse (14008), orifice pour obturateur (14009) de passage à la chambre
20 d'extraction-purification-lavage avec chromatographie par échange d'anion(14061)
 - *.d'une chambre d'extraction-purification-lavage avec chromatographie par échange d'anions (14061) pourvue d'une micro-colonne de chromatographie par échange d'anions (14117), avec orifice (14029) pour obturateur permettant d'isoler ladite
25 microcolonne (14117), orifice d'introduction du réactif d'élution (14113), orifice (14038) d'introduction des réactifs de lavage de ladite micro-colonne (14117), orifice pour évacuation des réactifs de lavage (14011), obturateur (14028) de passage de l'ADN purifié par chromatographie par échange d'anions à la chambre (14063) d'extraction-purification-lavage sur matrice de gel de silice.
 - 30 * d'une chambre d'extraction-purification-lavage sur matrice de gel de silice (14063) pourvue d'une micro-colonne sur matrice de gel de silice (14017), avec orifice (14010) d'introduction des réactifs de lavage de la microcolonne sur matrice de gel de silice (14017), orifice d'introduction du réactif d'élution (14013), obturateur (14026)
35 pour isoler ladite microcolonne (14017) sur matrice de gel de silice, obturateur (14024) de passage à la chambre de préparation de l'ADN purifié,
 - *d' une chambre de préparation de l'ADN purifié (14064) avec orifice d'introduction (14012) du tampon adéquat pour la méthode d'amplification de l'ADN choisie et

donnant accès auxdits micro-canaux (41) de ladite sous partie (14145), ledit tampon étant privé des enzymes, des primers et des dNTP nécessaires à l'amplification

Dans ce mode de réalisation de l'invention, l'échantillon d'ADN est introduit dans la chambre de lyse cellulaire et de filtration par le dit orifice (14007). Les réactifs de lyse sont introduits par ledit orifice (14008). Les débris cellulaires de lyse sont filtrés sur les microfiltres (14016), et le lysat est introduit dans la chambre (14061) d'extraction-purification-lavage avec micro-colonne de chromatographie par échange d'anions (14117). Après l'adsorption de l'ADN sur ladite micro-colonne (14117), on procède à l'introduction des réactifs de lavage de ladite micro-colonne (14117) qui sont évacués par l' orifice (14011). Ensuite on isole grâce à un obturateur introduit par l'orifice (14029) ladite microcolonne (14117), puis on procède à l'élution de l'ADN en introduisant le réactif d'élution par l'orifice (14113). Le retrait des obturateurs (14028) et (14029) permet à l'éluat de passer dans la chambre d'extraction-purification-lavage sur matrice de gel de silice (14063). L'ADN subit une deuxième purification sur la microcolonne (14017) de gel de silice. Après un lavage avec des réactifs de lavage introduits par l' orifice (14010), centrifugation et isolement de ladite microcolonne sur matrice de gel de silice (14017) par l'action de l'obturateur (14026), le réactif d'élution est introduit par l'orifice (14013). Puis le retrait de l' obturateur (14024) permet le passage à la chambre (14064) de préparation de l'éluat, si bien que dans le process l'ADN passe successivement sur la micro-colonne de chromatographie par échange d'anions (14117) puis sur la micro-colonne de gel de silice (14017). Dans ladite chambre de préparation de l'ADN purifié (14064), on mélange ledit ADN purifié avec le tampon adéquat pour la méthode d'amplification de l'ADN choisie, ledit tampon étant introduit par l'orifice (14012) et étant privé des enzymes, des primers et des dNTP nécessaires à l'amplification. Ensuite ledit mélange de l'ADN purifié et du tampon d'amplification est introduit dans lesdits micro-canaux (41) avec micro-mélangeurs (14019) de ladite sous partie (14145). Une connexion avec d'autres empilements de modules élémentaires plats permet le mélange de l'ADN avec les réactifs spécifiques ou onéreux de l'amplification souhaitée dans chaque micro-canal (41) et finalement dans chaque micropuits (42), lesdits réactifs spécifiques ou onéreux étant tels qu'enzymes nécessaires à la méthode d'amplification choisie, déoxynucléotides et primers d'amplification. Lesdits réactifs spécifiques ou onéreux peuvent être aussi des primers modifiés adaptés à la méthode de détection choisie, des sondes supplémentaires nécessaires à la méthode d'amplification choisie, des déoxynucléotides modifiés, des didéoxynucléotides, des didéoxynucléotides modifiés, des analogues peptidiques de sondes tels que des PNA, etc.

35

La Figure 41 B, la Figure 52A, la Figure 52B, la Figure 52C représentent un autre mode de réalisation de l'invention et réside dans des micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (15319) dédiés à l'analyse de fragments d'ADN avec une préparation intégrée comprenant la lyse cellulaire, la filtration des débris, l'extraction-purification de l'ADN sur une micro-colonne de

gel de silice, l'amplification en amont dudit micro-array ou macro-array multibloc (15319) par une des méthodes connues de l'Homme de l'Art, puis la détection sur ou en aval dudit micro-array ou macro-array multibloc (15319) par une des méthodes connues de l'Homme de l'Art..

- 5 Lesdits micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (15319) de micro-puits (42) sont constitués par empilement de modules élémentaires plats (15110), pourvus de deux sous-parties (15155) et (15145).

Ainsi que le montre la Figure 41 B, ladite sous-partie (15155) comporte une circuiterie micro-fluidique (15055), composée:

- 10 *d' une chambre de lyse cellulaire et de filtration (15015) pourvue de microfiltres (15016), avec orifice d'introduction de l'échantillon (15007), orifice d'introduction des réactifs de lyse (15008), orifice pour obturateur (15009) de passage à la chambre d'extraction-purification-lavage (15061),
- 15 *d'une chambre d'extraction-purification-lavage (15061) pourvue d'une micro-colonne (15017), avec orifice (15029) pour obturateur permettant d'isoler la microcolonne (15017), orifice d'introduction du réactif d'élution (15013), orifice (15038) pour introduction du réactif de lavage, orifice pour évacuation des réactifs de lavage (15011), obturateur (15024) de passage à la chambre de préparation de l'ADN purifié,
- 20 *d' une chambre de préparation de l'ADN purifié (15064) avec orifice d'introduction (15012) du tampon adéquat pour la méthode d'amplification de l'ADN choisie et donnant accès auxdits micro-canaux (41) de ladite sous partie (15145), ledit tampon étant privé des enzymes, des primers et des dNTP nécessaires à l'amplification

- 25 Ladite sous-partie (15145) comporte les micro-canaux (41) pourvus de micromélangeurs (15019).

Pour ce mode de réalisation de l'invention, la Figure 42 montre qu'un process de préparation intégrée de l'ADN sur micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (15319) peut avoir lieu dans des modules plats (15110) où a déjà été introduit dans la chambre (15064) par l'orifice (15012) un tampon adéquat pour l'amplification, ledit tampon étant privé des enzymes, des primers et des dNTP nécessaires à l'amplification. L'échantillon d'ADN est introduit dans la

30 chambre de lyse cellulaire et de filtration (15015) par le dit orifice (15007).

Ont ensuite lieu des réactifs de lyse par l'orifice (15008), les débris cellulaires de lyse étant filtrés sur les microfiltres (15016), puis le passage du lysat, en ouvrant l'obturateur (15009), dans la chambre (15061) d'extraction-purification-lavage avec micro-colonne sur matrice de gel de silice (15017). Le trop-plein de lysat est évacué par l'orifice (15011) tandis que ladite microcolonne sur matrice de gel de silice (15017) est isolée par l'action de l'obturateur (15029). L'isolement permet de garder une quantité suffisante de lysat qui va continuer de

35 délester son ADN sur ladite micro-colonne (15017) pendant que d'éventuels débris résiduels

sont évacués. Une centrifugation a lieu pour évacuer des contaminants. On procède ensuite à un lavage avec des réactifs introduits par l' orifice (15038), puis à l'évacuation des réactifs de lavage par l'orifice (15011), puis à l'introduction du réactif d'élution par l'orifice (15013), le retrait de l' obturateur (15024) permet à l'éluat de passer à la chambre (15064) de préparation de l'ADN purifié et de se mélanger avec le tampon adéquat pour la méthode d'amplification choisie.

La Figure 52A montre que ledit mélange de l'ADN purifié et du tampon d'amplification est introduit dans lesdits micro-canaux (41) avec micro-mélangeurs (15019) de ladite sous partie (15145).

La Figure 52B montre une connexion dudit micro-array ou macro-array (15319) de l'invention avec d'autres empilements de modules élémentaires plats (9245) , lesdits modules élémentaires plats (9245) étant pourvus de microcanaux (9241) avec micromélangeurs (92019), lesdits microcanaux (9241) débouchant dans l'épaisseur et sur la tranche desdits modules élémentaires plats (9245) par des orifices convertis en micropuits (9242) . Lesdits modules élémentaires plats sont connectés à l'autre extrémité à des modules élémentaires plats (9255) pourvus de microréservoirs (9210). Lesdits micro-réservoirs (9210) contiennent les réactifs spécifiques ou onéreux de l'amplification souhaitée dans chaque micro-canal (9241) et par conséquent dans chaque micropuits (9242). Cette connexion permet le mélange de l'ADN avec les réactifs spécifiques ou onéreux de l'amplification souhaitée dans chaque micro-canal (41) et par conséquent dans chaque micropuits (42).

Lesdits réactifs spécifiques ou onéreux sont les enzymes nécessaires à la méthode d'amplification choisie, les déoxynucléotides et les primers d'amplification. Ils peuvent être aussi des primers modifiés adaptés à la méthode de détection choisie, des sondes supplémentaires nécessaires à la méthode d'amplification et de détection choisie, des déoxynucléotides modifiés, des didéoxynucléotides, des didéoxynucléotides modifiés, des analogues peptidiques de sondes tels que des PNA, etc.

Des fragments d'ADN peuvent être amplifiés dans de très petits volumes, sous certaines conditions de passivations des surfaces de support de la réaction (Wilding P. , Shoffner M.A., Kricka L.J.PCR in a silicon microstructure. Clin. Chem. 1994, 40/9, 1815-1818. _ Shoffner M.A., Cheng J., Hvichia G.E., Kricka L.J., Wilding P. Chip PCR. I . Surface passivation of microfabricated silicon-glass chips for PCR. Nucleic Acids Research, 1996, 24, 2, 375-379. _ Cheng J, .Shoffner M.A., Hvichia G.E., Kricka L.J., Wilding P. Chip PCR. I I. Investigation of different PCR amplification systems in microfabricated silicon-glass chips. Nucleic Acids Research, 1996, 24, 2, 380-385.).

Il existe de nombreuses méthodes d'amplification de l'ADN bien connues de l'Homme de l'Art. Ce sont par exemple, pour les plus connues de ces méthodes, la PCR, la RT-PCR, la LCR, la NASBA, la SDA, la TMA, la RCA, etc. Dans la méthode d'amplification par PCR, comme dans beaucoup d'autres méthodes d'amplification de l'ADN ou de l'ARN bien
5 connues de l'Homme de l'Art, on utilise un couple de primers spécifiques du fragment à amplifier. Les deux primers sont deux oligonucléotides spécifiques. Le premier oligonucléotide spécifique est complémentaire d'une séquence située sur le brin «sens» à une extrémité du fragment d'ADN double brin à amplifier.
Le deuxième oligonucléotide spécifique est complémentaire d'une séquence située sur le
10 brin «anti-sens» à l'autre extrémité de ce même fragment d'ADN double brin à amplifier.

De même, dans la méthode d'amplification par PCR, comme dans beaucoup d'autres méthodes d'amplification de l'ADN bien connues de l'Homme de l'Art, on utilise une
ADN polymérase, un tampon et des déoxynucléotides. Dans la PCR, on fabrique directement
15 des copies des deux brins par élongation à partir de primers qui se sont hybridés (appariés) à la séquence complémentaire sur un monobrin du fragment d'ADN à amplifier. L'élongation est l'incorporation successive des déoxynucléotides sur un brin néoformé grâce à l'action de l'ADN Polymérase qui progresse dans le sens 5'→3'. Le déoxynucléotide incorporé sur le brin néoformé est celui qui est complémentaire du nucléotide sur le brin copié. Une
20 alternance de températures, soit dans le temps, soit dans l'espace, permet de commander un appariement ou hybridation entre les brins copiés, ou au contraire la dénaturation desdits brins copiés. Les températures élevées favorisent la dénaturation, les températures modérées favorisent le réappariement. Tout brin copié peut être réapparié avec le brin copié complémentaire, le nouveau fragment d'ADN double brin ainsi formé peut lui-même servir
25 de matrice et être copié par le même procédé. A chaque alternance, dans le temps ou l'espace, de température modérée-température élevée-température modérée, tous les fragments d'ADN sont copiés en un exemplaire, ce qui représente un doublement du nombre de ces fragments. Le nombre d'alternances de températures que subissent les fragments d'ADN est donc le nombre de doublements du nombre de fragments d'ADN cible.

30 Deux brins d'ADN s'apparient au-dessous d'une température dite T_m . Les meilleures spécificités dans l'amplification sont obtenues lorsqu'on apparie les primers à la température la plus haute possible, de manière à désappairer tous les appariements non spécifiques et à ne conserver que les appariements spécifiques, c'est à dire ceux d'un primer et du brin à
35 amplifier, ceux du brin en cours d'élongation et du brin à amplifier, et ceux des 2 brins complémentaires du fragment d'ADN à amplifier. On va donc hybrider les primers à des températures les plus proches possibles de leurs température T_m , à une température T_a dite température d'annealing (généralement fixée à $T_m-5^\circ\text{C}$).

Différentes amplifications sur différents fragments d'ADN diffèrent par leur T_m et donc leur T_a .

Les températures d'annealing ne doivent être ni trop élevées, sous peine de ne rien amplifier, ni trop basses, sous peine de ne pas être assez spécifiques. De même, la concentration en
5 MgCl₂ doit être optimisée: une concentration trop faible nuit au rendement, un excès induit un manque de spécificité. La spécificité est aussi aidée par le choix de certaines ADN Polymérase, ainsi que par les protocoles expérimentaux. Le premier cycle doit commencer à une température élevée

Un mélange réactionnel complet d'amplification de l'ADN doit être conservé à 4°C, pour
10 que l'ADN polymérase soit inactive. Si on la laissait être active entre 4° C et 60°C, des amplifications non spécifiques pourraient se produire.

Le premier cycle doit commencer à une température élevée, par exemple par la température de dénaturation à 92°C – 96 °C, pour que le mélange réactionnel passe le moins de temps possible dans une phase de réchauffement de 4°C à 60 °C, où le risque de réaction non
15 spécifique existe.

Si on veut éliminer totalement le risque de réaction non spécifique du mélange réactionnel entre 4°C et 65°C, il faut le séparer en 2 par une couche de paraffine, de telle manière que
20 cette séparation rende impossible la réaction. Seule la fusion de la paraffine à 65° C reconstituera le mélange réactionnel.

Lorsque plusieurs amplifications différentes sont effectuées en même temps avec le souhait de les optimiser toutes, une solution est de fixer des températures d'annealing spécifiques pour chaque amplification
25

Si par contre l'on est seulement désireux d'obtenir une amplification pour chaque fragment optimisée sur le plan de la spécificité, mais pas forcément sur celui du rendement, on peut tenter des températures d'annealing identiques et élevées pour toutes les amplifications, autour de 60°C pour des primers de 20 mers, et un peu moins pour des primers plus courts
30 (pour les primers de 20 mers, 60 °c entrainera une meilleure spécificité que 55 °C, mais pour certaines amplifications, le rendement sera un peu faible).

Enfin, certains travaux (par exemple Thuong et al, NucleicAcids Research, 1998, 26, 18, 4249-4258 ; Nucleic Acids Research, 1997, 25, 15, 3059-3065), décrivent des modifications de bases qui rendent les T_m de brins d'ADN indépendants de leur composition en bases. Ceci
35 fait envisager l'emploi de ce type de méthodes pour permettre une homogénéité des températures d'annealing pour un grand nombre d'amplifications effectuées en même temps.

En ce qui concerne le marquage pour la détection après l'amplification, plusieurs stratégies existent. On peut utiliser le fragment d'ADN amplifié que l'on va lier à une autre molécule,

en utilisant ou en combinant différentes propriétés chimiques, bien connues de l'Homme de l'Art, comme les réactions enzymatiques et la fluorescence. On peut aussi utiliser un marquage radioactif. L'ADN amplifié peut aussi être marqué par exemple par incorporation de deoxynucléotides marqués lors de l'élongation par l'ADN Polymérase pendant l'amplification.

Mais ce peut être aussi un primer qui peut être lié selon de nombreuses façons, bien connues de l'Homme de l'Art, à des molécules aidant la détection. Parmi de nombreux exemples, un primer peut être lié à un fluorophore pour la détection par fluorescence, ou à des molécules d'affinité comme la biotine pour que le brin d'ADN amplifié se lie à des billes coatées à la streptavidine, ou à des molécules d'étiquetage comme des oligonucléotides d'étiquetage. Le type de marquage va dépendre du type de détection (micro-électrophorèse, hybridation, spectrométrie de masse, chromatographie, micro-électrochromatographie, caméras CCD, fibres optiques, microscopie confocale, détection avec fluorescence, chimiluminescence, bioluminescence, colorimétrie, par surface plasmon resonance, par mesure de l'onde évanescente, par électrochimie, par radioactivité, etc) en adéquation avec le but de l'analyse.

On recherche parfois à sophistiquer la réaction d'amplification. Par exemple, dans les processus combinant l'amplification et le séquençage selon Sanger, on peut vouloir introduire un biais en incorporant non seulement des déoxynucléotides, mais aussi un certain pourcentage de didéoxynucléotides. Comme ces didéoxynucléotides sont correctement incorporés par l'ADN polymérase mais que par contre ils empêchent l'élongation de se poursuivre au-delà de leur propre incorporation, ils provoquent un arrêt dans la polymérisation de l'ADN et génèrent un certain pourcentage de fragments d'ADN représentant des copies partielles du fragment d'ADN à amplifier, dans la mesure où la copie commence bien mais se termine prématurément. Lorsqu'on hiérarchise ces fragments selon une variété de protocoles, on peut déterminer quel est le didéoxynucléotide qui a provoqué l'arrêt d'un fragment d'une longueur donnée, ce qui permet de découvrir la séquence de l'ADN amplifié. Une des méthodes pour hiérarchiser les fragments est la mobilité électrophorétique sur gel sur une seule ligne, mais avec des didéoxynucléotides marqués différemment, une autre est la mobilité électrophorétique sur gel sur 4 lignes, chaque ligne correspondant à une réaction où un seul des quatre didéoxy a été incorporé, une autre est la spectrométrie de masse qui mesure directement la masse des fragments, généralement dans quatre puits où la réaction de Sanger diffère par le didéoxynucléotide incorporé.

Selon une version de l'invention, dans chaque microcanal (41) d'un micro-array ou macro-array (15319), on procède au mélange de l'ADN purifié à analyser avec des primers spécifiques du fragment d'ADN à amplifier, les quatre déoxynucléotides dATP, dTTP, dGTP, dCTP, et avec l'enzyme utilisée pour la méthode d'amplification choisie, par connexion avec

un deuxième micro-array ou macro-array multibloc formé par empilement de modules élémentaires plats (9245). Lesdits modules élémentaires plats (9245) amènent, à partir de micro-réservoirs portés par lesdits modules élémentaires plats (9255) auxquels ils sont connectés, le mélange voulu de ladite enzyme, des déoxynucléotides, et desdits primers d'amplification pour qu'un fragment précis de l'ADN soit amplifié et présenté dans un micro-puits précis (42) dudit micro-array ou macro-array (15319). Ceci permet, par le biais des jonctions étanches ainsi réalisées, de préparer l'ADN pour des amplifications puis des détections sur de très faibles quantités dans une configuration de grande compacité dans des conditions étanches et sans rupture de chaîne, avec comme corollaires d'éviter l'évaporation et les contaminations.

La construction des primers utilisés pour l'amplification dépend de la méthodologie choisie. Par exemple, ce peuvent être des primers "beacons", avec deux séquences complémentaires l'une de l'autre rajoutées aux extrémités, l'une liée à un fluorophore, l'autre liée à un répresseur. Ces primers ont la particularité de n'être détectables par un signal fluorescent qu'à partir du moment où ils s'hybrident à un brin complémentaire d'ADN, ce qui éloigne le répresseur du fluorophore et permet l'émission d'un signal fluorescent. (Tyagi S., Kramer F.R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*, 1996, 14, 303-308. _ Tyagi S., Bratu D.P., Kramer F.R. Multicolor beacons for allele discrimination. *Nature Biotechnology*, 1998, 16, 49-53. _ Leone G., van Schijndel H., van Gemen B., Kramer F.R., Schoen C.D. Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26, 9, 2150-2155.). La détection de fluorescence des beacons moléculaires peut se faire en temps réel par mesure de l'onde évanescente à partir de fibres optiques (Liu X, Tan W. A Fiber-Optic Evanescent Wave DNA biosensor based on novel molecular beacons. *Anal. Chem.* 1999, 71, 5054-5059)

Dans le mélange réactionnel, il peut être rajouté à partir desdits modules élémentaires plats (9245) des réactifs spécifiques d'autres méthodologies de détection de l'amplification en temps réel comme celles décrites par Kalinina O., Lebedeva I., Brown J., Silver J. Nanoliter scale PCR with Taqman detection. *Nucleic Acids Research*, 1997, Vol. 25, No 10, 1999-2004. _ Holland P. M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991, 88, 7276-7280. _ Lee L.G., Connell, C.R., Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids research*, 1993, 21, 16, 3761-3766. _ Livak K, Flood, S.J.A., Marmaro J. Giusti W., Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications.* 357- 362, 1995. _ Mullah B., Livak K, Andrus A., Kenney P. Efficient synthesis of double-dye-labeled oligodeoxyribonucleotide probes and their

application in a real time PCR assay. Nucleic Acids Research, 1998, Vol 26, No4. _ Gibson U.E.M., Heid C.A., Williams P.M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Research, 1996, 995-1001. _ Heid C.A., Stevens J; Livak K.J., Williams P.M. Real time Quantitative PCR .Genome Research, 1996, 986-994.

- 5 Ainsi, une amplification détectée par l'activité exonucléasique d'une ADN polymérase nécessite l'emploi d'une troisième sonde complémentaire d'une séquence à l'intérieur du fragment d'ADN à amplifier, et liée à un fluorophore et à son répresseur. Lors de l'élongation, l'activité exonucléasique de l'ADN Polymérase va séparer le fluorophore de son répresseur et permettre l'émission d'un signal. Cette troisième sonde peut être rajoutée au mélange
10 réactionnel conservé au froid avec les primers et les déoxynucléotides, et l'ADN Polymérase. D'autres méthodes de détection de l'amplification en temps réel peuvent être mises en œuvre.

- Puis on procède à l'amplification spécifique d'un fragment d'ADN par une des méthodes d'amplification connues en l'Etat Actuel de l'Art en pourvoyant le dispositif de réchauffeurs
15 chargés de tempérer tout ou partie desdits microcanaux (41) desdites unités fonctionnelles planes (15145) et tout ou partie desdits microcanaux (9241) desdites unités fonctionnelles planes (9245), de manière à ce que la température desdits microcanaux (41) et micro-canaux (9241) convienne à tout moment au protocole de la méthode d'amplification d'ADN choisie. Certaines méthodes d'amplifications sont isothermes, comme la SDA. De plus, on peut
20 adresser électroniquement chaque micro-puits pour exercer un contrôle individualisé sur les réactions d'amplification et d'hybridation (Westin L, Xu X, Miller C, Wang L, Edman CF, Nerenberg M. Anchored multiplex amplification on a micro-electronic chip array. Nature Biotechnology, 2000, 18, 199-204).

- De même, chaque micro-puits d'un micro-array ou macro-array multibloc de l'invention peut
25 être adressé individuellement par des électrodes pour contrôler la réaction en cours dans ledit-micro-puits.

- Le dispositif selon l'invention est utilisable pour sa propre fabrication à l'usine si l'on veut fabriquer des unités fonctionnelles planes prêtes à l'emploi pour l'amplification d'ADN.
30 A l'usine de fabrication, dans chaque microcanal (41) d'un micro-array (15319), on peut procéder à l'introduction de primers spécifiques, des déoxynucléotides, de l'enzyme d'amplification pendant les phases terminales de fabrication des unités modules plats (15110), de manière à ce que, lors d'une utilisation sur le terrain pour amplifier un fragment d'ADN, l'opération d'ajouter lesdits primers spécifiques au mélange réactionnel ne soit plus
35 nécessaire pour mener à bien pour ladite réaction d'amplification. De cette façon l'on peut disposer d'un micro-array ou macro-array de l'invention "prêt-à-l'emploi".

Cette opération effectuée en usine peut éventuellement se faire grâce à une connexion orthogonale à un micro-array ou macro-array de l'invention, soit en fin de fabrication, soit en cours de fabrication.

L'ADN amplifié peut être détecté par une des méthodes de détection connues en l'Etat Actuel de l'Art, telle que détection de l'amplification directement en temps réel avec un marquage mesurable pendant l'amplification, ou détection par spectrométrie de masse, ou
5 détection par micro-électrophorèse, ou détection par chromatographie, ou détection par hybridation sur sondes. La fluorescence, la bioluminescence, la chimiluminescence, la colorimétrie, la mesure de l'onde évanescente, la surface plasmon resonance, l'électrochimie, le radioactivité, la densimétrie peuvent être utilisées.

Le marquage autorisant l'une de ces détections peut être par fluorescence, bioluminescence,
10 chemiluminescence, ou bien effectué avec des molécules ayant un différentiel de potentiel d'oxydo-réduction, ou avec molécules étiquette tels qu'une courte séquence oligonucléotidique, ou avec molécules d'affinité, ou une combinaison desdites méthodes de marquage précédentes.

Dans le cas de détection par hybridation sur sondes, ladite hybridation peut être détectée par
15 de nombreux procédés, dont des procédés avec marquage, des procédés sans marquage, des procédés d'observation dynamique de l'évolution de l'hybridation.. Parmi les très nombreuses méthodes de détection de l'hybridation, citons entre autres les méthodes colorimétriques, par fluorescence, par radioactivité, par surface plasmon resonance, par spectrométrie de masse, etc.

20 On peut procéder, dans chaque micropuits (42) d'un micro-array ou macro-array multibloc (15319) à la détection de l'amplification en temps réel par fluorescence par une des méthodes connues en l'Etat Actuel de l'Art, comme par exemple la méthode dite de primers sous forme de «beacons moléculaires» avec fluorophores et répresseurs, ou la méthode dite «Taqman»
25 de détection d'une activité exonucléasique de l'ADN polymérase grâce à un fluorophore et un répresseur pendant les élongations ayant cours lors des méthodes d'amplification. Cette détection peut être effectuée ou non à travers un couvercle transparent.

On peut aussi transférer les ADN amplifiés présentés dans ledit micro-array ou macro-array
30 multibloc (15319) sur un micro-array monobloc (340) et procéder à la détection dans ledit micro-array ou macro-array monobloc (340), ce dernier pouvant être pourvu d'un couvercle transparent.

On peut également conditionner les ADN amplifiés présents dans ledit micro-array ou
macro-array multibloc (15319) en utilisant des transferts en série sur d'autres micro-array ou
35 macro-array multiblocs pour procéder à des rajouts de réactifs accompagnés ou non de lavages, de séparations, de fixations et de purifications.

Par exemple, on peut commencer par amplifier les ADN avec un des deux primers biotynilés dans un premier micro-array ou macro-array multibloc (15319), ce qui permet, dans des conditions dénaturantes, de séparer les deux brins de l'ADN amplifié double brin sur des

billes magnétiques coatées à la streptavidine. Cette séparation peut avoir lieu dans les micro-puits d'un deuxième micro-array ou macro-array multibloc remplis desdites billes coatées à la streptavidine, ou bien dans un micro-array ou macro-array pourvu de microcanaux avec portions élargies et remplies desdites billes coatées à la streptavidine. Cette méthode de
5 séparation des deux brins permet de séparer d'une part le brin d'ADN amplifié biotynilé avec les billes magnétiques, et d'autre part le brin d'ADN amplifié libre dans le surnageant.

On peut en outre procéder, dans chaque micropuits (42) d'un micro-array ou macro-array multibloc (15319) à la détection de l'amplification par spectrométrie de masse par une des
10 méthodes connues en l'Etat Actuel de l'Art.

Par exemple, pour suivre selon l'invention une préparation de l'ADN pour une des méthodes de détection par spectrométrie de masse MALDI-TOF (décrite par Little D.P., Cornish T.J., O'Donnell M.J., Braun A., Cotter R.J., Köster H. . MALDI on a chip: analysis of arrays of low-femtomole to subfemtomole quantities of synthetic oligonucleotides and DNA
15 diagnostic products dispensed by a piezo-electric pipet. Anal. Chem. 1997, 69, 4540-46.) , l'ADN peut être amplifié dans les micro-canaux (41) d'un micro-array ou macro-array multibloc (15319) avec un des deux primers biotynilés, puis les deux brins de l'ADN amplifié double brin peuvent être séparés grâce à des billes magnétiques logées dans les portions élargies desdits microcanaux (41). Le surnageant contenant l'ADN amplifié monobrin peut
20 être présenté dans les micropuits (42) dudit micro-array ou macro-array (15319) et mélangé à un dérivé de l'acide hydroxysuccinique ou hydroxypiccolinique, soit directement sur ledit micro-array ou macro-array multibloc (15319), soit dans les micro-puits d'un autre macro-array ou micro-array multibloc connecté. Un tir au laser dans chaque micro-puits permet alors d'ioniser le fragment d'ADN et de l'accélérer dans une champ électrique pour une
25 détection par spectrométrie de masse., où la comparaison de la masse attendue dudit fragment d'ADN et la masse mesurée permet de confirmer la conformité du fragment. à la masse attendue

Cet exemple de process de détection par spectrométrie de masse MALDI-TOF est cité pour
30 montrer la polyvalence et la grande adaptabilité des micro-arrays ou macro-arrays multiblocs de l'invention. En spectrométrie de masse, par exemple, d'autres méthodes ne nécessitent pas la séparation des deux brins sur billes de streptavidine. Dans les autres possibilités de détection, de très nombreuses variantes existent également, variantes auxquelles peuvent s'adapter les micro-arrays ou macro-arrays multiblocs de l'invention.

35 On peut par exemple procéder à la détection d'un fragment d'ADN par micro-électrophorèse par une des méthodes connues en l'Etat Actuel de l'Art, avec marquage et détection par

- exemple par fluorescence ou par chimiluminescence ou par bioluminescence ou par électrochimie (Waters L.C., Jacobson S.C., Kroutchinina N., Khandurina J., Foote R.S., Ramsey J.M.. Microchip device for cell lysis, multiplex PCR amplification, and electrophoretic sizing. *Anal. Chem.*, 1998, 70, 158-162. _ Mc Cormick R.M., Nelson R.J.,
- 5 Alonso-Amigo M.G., Benvegnu D.J., Hooper H.H. Microchannel electrophoretic separations of DNA in injection-molded plastic substrates. *Anal. Chem.*, 1997, 69, 2626-2630. _ Burns M.A., Mastrangelo C.H., Sammarco T.S., Man F.P., Webster J.R., Johnson B.N., Foerster B., Jones D., Fields Y., Kaiser A., Burke D. Microfabricated structures for integrated DNA analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 5556-5561. _ Woolley A.T.,
- 10 Hadley D., Landre P., de Mello A.J., Mathies R.A., Northrup M.A.. Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device. *Anal. Chem.*, 1996, 68, 4081-4086. _ Woolley A.T., Hadley D., Landre P., de Mello A.J., Mathies R.A., Northrup M.A. Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device. *Anal. Chem.*, 1996, 68, 4081-
- 15 4086. _ Wilding P., Kricka L.J., Cheng J., Hvichia G., Shoffner M.A., Fortina P. Integrated cell isolation and polymerase chain reaction analysis using silicon microfilter chambers. *Analytical Biochemistry*, 1998, 257, 95-100. _ Cheng J., Waters L.C., Fortina P., Hvichia G., Jacobson S.C., Ramsey J.M., Kricka L.J., Wilding P. Degenerate oligonucleotide primed polymerase chain reaction and capillary electrophoresis analysis of human DNA on
- 20 microchip-based devices. *Analytical Biochemistry*, 1998, 257, 101-106. _ Ueno K., Yeung E.S. Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip. *Anal. Chem.*, 1992, 64, 1926-1932. _ Manz A., Harrison D.J., Verpoorte E.M.J., Fetting J.C., Paulus A., Lüdi H., Widmer H.M. Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems. *Capillary electrophoresis*
- 25 on a chip. *J. of Chromatography*, 1992, 593, 253-258. _ Harrison D.J., Fluri K., Seiler K., Fan Z., Effenhauser C.S., Manz A. Micromachined a miniaturized capillary electrophoresis-based chemical analysis system on a chip. *Science*, 1993, 261, 895-897 _ Liang Z., Chiem N., Ocvirk G., Tang T., Fluri K., Harrison D.J.. Microfabrication of a planar absorbance and fluorescence cell for integrated capillary electrophoresis devices. *Anal. Chem.*, 1996, 1040-
- 30 1046. _ Coyer C.L., Tang T., Chiem N., Harrison D. Clinical potential of microchip capillary electrophoresis systems. *Electrophoresis*, 1997, 18, 1733-1741. _ Li P.C.H., Harrison J.D. Transport, manipulation, and reaction of biological cells On-chip using electrokinetic effects. *Anal. Chem.*, 1997, 69, 1564-1568. _ Effenhauser C.S., Manz A., Widmer H.M. Glass chips for high-speed capillary electrophoresis separations with
- 35 submicrometer plate heights. *Anal. Chem.* 1993, 65, 2637-2642. _ Effenhauser C.S., Paulus A., Manz A., Widmer H.M. High-speed separation of antisense oligonucleotides on a micromachined capillary electrophoresis device. *Anal. Chem.* 1994, 66, 2949-2953. _ Effenhauser C.S., Bruin G.J.M., Paulus A. Integrated chip-based capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 1997, 18, 2203-2213. _ Effenhauser C.S., Bruin G.J.M., Paulus A., Ehrat

- M. Integrated capillary electrophoresis on flexible silicone microdevices: analysis of DNA restriction fragments and detection of single DNA molecules on microchips. *Anal. Chem.* 1998, 69, 3451-3457. _ Jacobson S.C., Koutny L.B., Hergenröder R., Moore A.W., Ramsey J.M. . Microchip capillary electrophoresis with an integrated postcolumn reactor. *Anal. Chem.* 1994, 66, 3472-3476. _ Jacobson J.C., Ramsey J.M.. Integrated microdevice for DNA restriction fragment analysis. *Anal. Chem.*, 1996, 68, 720-723. _ Waters L.C., Jacobson S.C., Kroutchinina N., Khandurina J., Foote R.S., Ramsey J.M. Microchip device for cell lysis, multiplex-PCR amplification, and electrophoretic sizing. *Anal. Chem.*, 1998, 70, 158-162. _ Fister J.C., Jacobson S.C., Davis L.M., Ramsey J.M. Counting single chromophore molecules for ultrasensitive analysis and separations on microchip devices. *Anal. Chem.*, 1998, 70, 431-437. _ Hurst G.B., Weaver K., Doktycz. Simultaneous monitoring of DNA fragments separated by electrophoresis in a multiplexed array of 100 capillaries. *Anal. Chem.*, 1994, 66, 1424-1431. _ Mc Cormick R.M., Nelson R.J., Alonso-Amigo M.G., Benveniste D.J., Hooper H.H. Microchannel electrophoretic separations of DNA in injection-molded plastic substrates. *Anal. Chem.* 1997, 69, 2626-2630. Burns M.A., Mastrangelo C.H., Sammarco T.S., Man F.P., Webster J.R., Johnson B.N., Foerster B., Jones D., Fields Y., Kaiser A., Burke D. Microfabricated structures for integrated DNA analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 5556-5561. _ Huang X.C., Quesada M.A., Mathies R.A. Capillary array electrophoresis using laser-excited confocal fluorescence detection. *Anal. chem.* 1992, 64, 967-972. _ Huang X. C., Quesada M.A., Mathies R.A. DNA sequencing using capillary array electrophoresis. *Anal. Chem.* , 1992, 64, 2149-2154. _ Woolley A.T., Mathies R.A. Ultra high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis. *Proc. Natl. acad. sci. USA*, 1994, 91, 11348-11352 _ Haab B.B., Mathies R.A. A single molecule fluorescence burst detection of DNA fragments separated by capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, 1995, 67, 3253-3260. _ Zhu H., Clark S.M., Benson S.C., Rye H.S., Glazer A.N., Mathies R.A. High-sensitivity capillary electrophoresis of double-stranded DNA fragments using monomeric and dimeric fluorescent intercalating dyes. *Anal. Chem.*, 1994, 66, 1941-1948. _ Wang, Ju J., Carpenter B.A., Atherton J.M., Sensabaugh G.F., Mathies R.A. Rapid sizing of short tandem repeat alleles using capillary array electrophoresis and energy transfer fluorescent primers. *Anal. Chem.*, 1995, 67, 1197-1203. _ Woolley A.T., Hadley D., Landre P., de Mello A.J., Mathies R.A., Northrup M.A. Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device. *Anal. Chem.*, 1996, 68, 4081-4086. _ Kheterpal I., Scherer J.R., Clark S.M., Radhakrishnan A., Ju J., Ginther C.L., Sensabaugh G.F., Mathies R.A. DNA sequencing using a four-color confocal fluorescence capillary array scanner. *Electrophoresis*, 1996, 17, 1852-1859. _ Wang Y., Wallin J.W., JU J., Sensabaugh G.F., Mathies R.A. High-resolution capillary array electrophoretic sizing of multiplexed short tandem repeat loci using energy-transfer fluorescent primers. *Electrophoresis* 1996, 17, 1485-1490. _ Woolley A.T., Sensabaugh G.F., Mathies R.A. High-speed DNA genotyping

- using microfabricated capillary array electrophoresis chips. *Anal. Chem.* 1997, 69, 2181-2186. _ Woolley A.T., Lao K., Glazer A.N., Mathies R.A. Capillary electrophoresis chips with integrated electrochemical detection. *Anal. Chem.*, 1998, 70, 684-688. _ Woolley A.T., Hadley D., Landre P., de Mello A.J., Mathies R.A., Northrup M.A.
- 5 Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device. *Anal. Chem.*, 1996, 68, 4081-4086. _ Mansfield E.S. et al. Versatile low-viscosity sieving matrices for non-denaturing DNA separations using capillary array electrophoresis. *Electrophoresis*, 1997, 18, 104-111. _ Simpson P.C., Roach D., Woolley A.T., Thorsen T., Johnston R., Sensabaugh G.F., Mathies R.A.
- 10 High throughput genetic analysis using microfabricated 96-sample capillary array electrophoresis microplates. *Pr.Natl.Acad.Sci. USA*, 1998, 95, 2256-2261. _ Jacobson SC, Hergenröder R, Koutny LB, Warmack RJ, Ramsey JM. Effects of injection schemes and column geometry on the performance of microchip electrophoresis devices. *Anal. Chem.*, 1994, 66, 1107-1113).
- 15 La Figure 53 montre un empilement de modules plats (40110) pourvus de sous-parties (40145) supportant tout ou partie des micro-canaux (41). L'empilement desdits modules élémentaires plats (40110) est effectué de manière décalée afin d'obtenir sur une face latérale un biseau. L'espacement entre lesdites sous-parties (40145) permet l'intercalation de modules
- 20 plats isolants électriques (40195) dans l'empilement.
- Ce microarray- ou macroarray multibloc en biseau peut être connecté à un deuxième empilement en biseau de modules élémentaires plats (40245) alternés avec des modules plats isolants.
- Lesdits modules élémentaires plats (40245) sont pourvus à leur extrémité d'un plage de
- 25 lecture (40250), ainsi que d'un dispositif d'évacuation des analytes.
- Après avoir soumis l'ADN amplifié à une réaction de Sanger dans les micro-canaux (41) desdits micro-array ou macro-arrays multiblocs (15319), ou alternativement sur un autre micro-array ou macro-array multibloc de l'invention provisoirement connecté, une microélectrophorèse peut être envisagée en apposant une tension aux deux extrémités des
- 30 microcanaux des modules élémentaires plats (40245) connectés en dernier lieu. La lecture des fragments d'élongation de la réaction de Sanger se fait sur la plage de lecture (40250) selon la méthode commandée par le type de marquage (fluorescence, électrochimie, etc).
- La détection d'analytes séparés par micro-électrophorèse peut aussi avoir lieu par spectrométrie de masse, ainsi qu'il est pratiqué pour des fragments de protéines (Minarik M,
- 35 Foret F, Karger BL. Fraction collection in micropreparative capillary zone electrophoresis and capillary isoelectric focusing. *Electrophoresis* 2000, 21, 247-254). Les micro-arrays ou macro-arrays de l'invention sont adaptés à ces process séquentiels.

Ainsi qu'il a été dit précédemment, les micro-arrays ou macro-arrays multiblocs de l'invention sont aussi adaptés à des process séquentiels, comme par exemple une séparation par chromatographie suivie d'une séparation par micro-électrophorèse (Cf Tragas C, Pawliszyn J. On-line coupling of high performance gel filtration chromatography with
5 imaged capillary isoelectric focusing using a membrane interface. Electrophoresis 2000, 21, 227-237).

On peut aussi détecter dans chaque micropuits (42) d'un micro-array ou macro-array multibloc (15319) l'hybridation d'un fragment d'ADN sur sondes telles que des
10 oligonucléotides ou des fragments d'ADN.
L'hybridation peut avoir lieu soit sur des billes qu'on peut transporter d'un endroit à un autre (Fan ZH, Mangru S, Granzow R, Heaney P, Ho W, Dong Q, Kumar R. Dynamic DNA hybridization on a chip using paramagnetic beads: Anal. Chem., 1999, 71, 4851-4859), soit sur une surface dédiée à cet usage.

15 Les sondes oligonucléotidiques sont généralement synthétisées selon la méthode phosphoramidite dans des systèmes automatisés. (Beaucage SL, Caruthers M.H. Deoxynucleoside phosphoramidites. A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. Tetrahedron Letters, vol 22, 70, 1859-1862. 1981. _
20 McBride L.J., Caruthers, M.H. An investigation of several oligonucleotide phosphoramidites useful for synthesizing deoxynucleotides Tetrahedron Letters 24 (3) :245-248, 1983. _
Sinha N.D. et al. Polymer Support oligonucleotide synthesis XVIII . Nucl. Acid Res. 12 (11) :4539-4556, 1984. _ Andrus A., Wright P., Wang J., Mullah B., Baier J., Mason G., Kaufman J. Synthesis and purification in a single column on a high-throughput automated
25 oligonucleotide production system. Nucleic Acids Symposium Series. N° 34, 183 - 184, 1995. _ Weiler J., Hoheisel J.D. Combining the preparation of oligonucleotide arrays and synthesis of high quality primers. Analytical Biochemistry. 1996. 243, 218 - 227. _ Beier M., Hoheisel JD. Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA microchips. Nuc. Ac. Res. 1999, 27, 9, 1970 - 1977 . _ Supports useful in solid phase
30 synthesis of oligonucleotides. Buendia J., Nierat J. Roussel Uclaf. US Patent 4 780 504. _ Multifunctional controlled pore glass reagent for solid phase oligonucleotide synthesis. Clontech Laboratories, Inc, Palo Alto, CA. US patent 5 141 813 _ Reusable solid support for oligonucleotide synthesis, process for production thereof and process for use thereof. Pon R., Yu S., Univ. Techn. Int..WO 9723496. _ Disposable reagent storage and delivery
35 cartridge. Kaplan B.E., Swiderski P.M.. City of Hope, Duarte, CA. US Patent 5 766 550. _ Singh R.K. et al. Protecting groups used in oligonucleotide synthesis : a current survey .J. Sci. & Ind. Res. 49 :441-448, 1990. _ Vu H et al. Fast oligonucleotide deprotection phosphoramidite chemistry for DNA synthesis. Tetrahedron Letters 31(50) :7269-7272, 1990. _ Base protecting groups and process of oligonucleotide synthesis. Yu D., Agrawal S.,

- Habus I., Iyer R.P., Hybridon Inc, WO Patent 9849183. _ Methods and reagents for cleaving and deprotecting oligonucleotides. Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA. US Patent 5 518 651 - Sindelar L.E., Jaklevic J.M. High throughput DNA synthesis in a multichannel format. Nucleic Acid Research, 1995, vol 23, n°6, 982 - 987. _ Rapid, large scale automatable high pressure peptide synthesis. Verlander M.S., Fuller W.D., Goodman M. Bio Research Inc. US Patent 4 192 798. _ Apparatus for high pressure peptide synthesis . Verlander M.S., Fuller W.D., Goodman M. Bio Research Inc. US Patent 4 362 699 _ Chemical synthesis apparatus for preparation of polynucleotides. Bender R., Duck P.D. Ens Bio Logicals US Patent 4 353 989. Multiple reactor system and method for polynucleotide synthesis. Urdea M.S., Warner B.D. Chiron Corporation. US Patent 4 517 338. _ Polynucleotide synthesizing apparatus. Niina A., Ohira T., Miyamoto S., Nippon Zeon Co Ltd, US Patent 4 671 941. _ Multiple polymer synthesizer. Judd AK. SRI International. US 5 053 454. _ Polynucleotide synthesizer. Whitehouse C.M., Whitehouse G.P., Sesholtz D.A., Norman D., Eastman Kodak Company, Rochester. . US patent 5 112 575. _ Automated synthesis of oligonucleotides. McGraw R.A., Grosse W.M., University of Georgia Research Foundation , Inc. US Patent 5368823. _ Apparatus for multiple simultaneous synthesis, Cody D.R., De Witt S.H.H., Hodges J.C., Kiely J.S., Moos W.H., Pavia M.R., Roth B.D., Schroeder M.C., Stankovic C.J., Warner-Lambert Company, US Patent 5 324 483 _ Method and apparatus for biopolymer synthesis. Zuckermann R.N., Heubner V.D., Santi D.V., Sianti M.A.. Chiron Corporation. US Patent 5 705 610. _ Method and apparatus for biopolymer synthesis. Zuckermann R.N., Heubner V.D., Santi D.V., Sianti M.A.. Chiron Corporation. US Patent 5 705 610. _ Microscale fluid handling systems. Karger B.L., Foret F., Zavracky, P.M., McGruer E.N., Xue Q., Dunayeskiy, Y.M., Northeastern University, Boston, MA, USA. US Patent 5 872 010. _ Methods and solvent vehicles for reagent delivery in oligonucleotide synthesis using automated pulse jetting devices. Gamble R.C., Theriault T.P., Winder S.C., Incyte Pharmaceutical , Inc, Palo Alto, CA. US Patent 5 874 554. _ Method and composition for oligonucleotide synthesis on an open environment support surface using high boiling point organic solvents to control evaporation. Frauendorf A. W., Brennan T.M., Protogene Lab Inc. WO Patent 99 25724. _ Very large scale immobilized polymer synthesis using mechanically directed flow paths. Winkler JL, Fodor SA, Buchko CJ, Ross DA, Aldwin L. Affymetrix, Inc Santa Clara. US Patent 5 885 837. _ General purpose gene synthesizer., Zelinka R.J., Itakura K., Sims C.W., Kaplan B.E., Systec Inc., US Patent 4 598 049. Remotely programmable matrices with memories. Nova M.P., Senyei A.E., IRORI, US 5 874 214. Method and apparatus for producing position addressable combinatorial libraries. Dehlinger PJ, Palo Alto, CA. US Patent 5 763 263 . Photoelectric synthesis of DNA or protein probe arrays. Krihak M., Lee H-C, Shieh CL. Motorola . US 5 4810 989 . Weiler J., Hoheisel J.D. Combining the preparation of oligonucleotide arrays and synthesis of high quality primers. Analytical Biochemistry. 1996. 243, 218 - 227. Beier M. , Hoheisel JD. Versatile derivatisation of solid

support media for covalent bonding on DNA microchips. Nuc. Ac. Res. 1999, 27, 9, 1970 - 1977. _ Process for combining parallel, oligonucleotide synthesis and preparation of oligomer chips. Weiler J., Hoheisel J.D. WO Patent 97 49714.

- 5 Les sondes oligonucléotidiques peuvent être synthétisées in situ dans lesdits micro-puits (42) d'un micro-array (15319) grâce à l'utilisation de groupements protecteurs photolabiles. (Photolabile reagents for incorporation into oligonucleotide chains. Urdea M.S., Horn Thomas, Chiron Corporation. US Patent 5 258 506 . . _ Large scale photolithographic solid phase synthesis of an array of polymers. Pirrung M.C., Read J.L., Fodor S., Stryer L. .
- 10 Affymax Technologies. US 5 405 783 . Very large scale immobilized polymer synthesis . Pirrung M.C., Read J.L., Fodor S., Stryer L. . Affymax Technologies. US 5 424 186 . _ Photolabile nucleoside and peptide protecting groups. Fodor S., Stryer R., Winkler JM, Holmes CP, Solas DW. Affymax Technologies. US Patent 5 489 678 . Spatially addressable immobilization of oligonucleotides and other biological polymers on surfaces. McGall. G.H.,
- 15 Fodor S., Sheldon E.L. Affymax Technologies. US 5 412 087.

La photoexposition pratiquée pour sélectionner les polymères à déprotéger se fait habituellement par photomasques. Mais elle peut aussi se faire grâce à l'utilisation de micro-miroirs digitaux (Singh-Gasson S, Green RD, Yue Y, Nelson C, Blattner F, Sussman MR, Cerrina F. Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide micro-arrays using a digital micromirror array . Nature Biotechnology.1999. Vol 17.974-978).

20

Les sondes oligonucléotidiques peuvent aussi être synthétisées à l'extérieur et déposées sur lesdits micro-puits (42) dudit micro-array ou macro-array multibloc (15319) ou par un bloc multi-arrayer ou grâce à un micro-array ou macro-array multibloc connecté de l'invention.

- 25 Des traitements de surface adéquats desdits micro-puits (42) peuvent autoriser une adsorption des sondes . Certaines méthodologies préconisent au contraire leur fixation covalente .

Dans un procédé de synthèse de sondes oligonucléotidiques, la synthèse peut être envisagée soit nucléotide par nucléotide, soit par groupes de plusieurs nucléotides. Les micro-arrays ou macro-arrays multiblocs de l'invention permettent, par exemple un synthèse in situ d'octamers à partir d'une bibliothèque de tetramers. Deux octamers peuvent ensuite être liés pour constituer un 16-mers.

30

- 35 Les Figures 54A, 54B, 54C, 54D montrent qu'on peut synthétiser in situ dans les puits d'un micro-array ou macro-array monobloc (339) des octa-nucléotides à partir de tetra-nucléotides préfixés et de tétranucléotides amenés par microcanaux (41) desdits micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (319) de l'invention.

Les Figures 55A, 55B, 55C, 55D montrent qu'on peut synthétiser in situ dans les micro-puits (42) d'un micro-array ou macro-array multibloc (319) des octa-nucléotides à partir de tétra-nucléotides préfixés et de tétranucléotides amenés par les microcanaux (41) desdits micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (319) de l'invention.

5

Les Figures 56A, 56B, 56C, 56D montrent qu'on peut synthétiser in situ dans des portions élargies des micro-canaux (41) d'un micro-array ou macro-array multibloc (319) des octa-nucléotides à partir de tétra-nucléotides préfixés et de tétranucléotides amenés par lesdits microcanaux (41) desdits micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (319) de l'invention. La même opération peut aussi être effectuée par connexion avec un autre micro-array ou macro-array multibloc de l'invention..

15

Les Figures 57A, 57B, 57C montrent qu'on peut synthétiser in situ dans les puits d'un micro-array ou macro-array monobloc (338) des puces à ADN dans chaque micro-puits dudit micro-array ou macro-array monobloc (338) en utilisant lesdits microcanaux (41) desdits micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (319) de l'invention pour amener les réactifs et en utilisant des groupements photolabiles et des micromasques pour photoexposition spécifique de chaque micro-puits dudit micro-array ou macro-array monobloc (338).

20

Le même résultat peut être obtenu en photoexposant chacun desdits micro-puits à l'aide de micro-miroirs, et en amenant les réactifs avec des micro-arrays ou des macro-arrays de l'invention connectés.

25

Les Figures 58A, 58B, 58C montrent qu'on peut synthétiser in situ dans les puits d'un micro-array ou macro-array multibloc (319) des puces à ADN dans chaque micro-puits (42) dudit micro-array ou macro-array monobloc (338) en utilisant lesdits microcanaux (41) desdits micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (319) de l'invention pour amener les réactifs et en utilisant des groupements photolabiles et des micromasques (187) pour photoexposition spécifique de chaque micro-puits (42) dudit micro-array ou macro-array multibloc (319).

30

Le même résultat peut être obtenu en photoexposant chacun desdits micro-puits à l'aide de micro-miroirs, et en amenant les réactifs avec des micro-arrays ou des macro-arrays de l'invention connectés..

35

Chaque puits d'un micro-array ou macro-array multiblocs de l'invention peut être adressé individuellement par des fibres optiques pour la détection des produits de réaction (Healey BG, Matson RS, Walt DR, Fiberoptic DNA sensor array capable of detecting point mutations, Anal. Biochem., 1997, 251, 270-279), ou pour contrôler des réactions électro-

cinétiques ou l'aggrégation de micro-particules ou de molécules dans ledit micropuits (WO9740385A1 - Light-controlled electrokinetic assembly of microparticles near surfaces), ou pour diriger une photoexposition dans ledit micro-puits.

- 5 L'étanchéité de connexion entre deux desdits micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (3119) est assurée par l'emploi de polymères, soit par l'emploi de polymères pour fabriquer dans la masse les modules plats constituant l'empilement desdits micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (3119), soit par revêtement avec un polymère de la tranche de chacun desdits modules plats constituant l'empilement, soit par l'usage d'une pièce intermédiaire
- 10 monobloc en polymère faisant office de joint entre deux desdits micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (3119).

- Un marquage de type code barre ou code couleur ou électromagnétique de chaque module plat devant être inclus dans la constitution d'un micro-array de l'invention dédié à un
- 15 échantillon ou à une opération spécifique permet la recomposition d'empilements de modules plats ayant reçu des réactifs spécifiques dans d'autres empilements

20

25

30

35

40

REVENDICATIONS

- 1- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" (3119) au sens de micro-réseaux quadrillés plans
5 denses ou très denses de puits ou de micro-emplacements où sont déposées ou
synthétisées de petites quantités de molécules chimiques, biologiques ou organiques,
caractérisés en ce qu'ils sont multi-blocs et micro-fabriqués par superposition et
empilement de modules élémentaires plats (1) typiquement de forme aplatie, lesdits
10 modules élémentaires plats (1) étant pourvus d'une part d'orifices d'introduction et
d'évacuation des échantillons et des réactifs situés uniquement dans leur épaisseur et sur
leur tranche, lesdits modules élémentaires plats (1) étant pourvus d'autre part de
connexions électriques situées uniquement dans leur épaisseur et sur leur tranche, lesdits
modules élémentaires plats (1) étant pourvus aussi d'un circuit fluide avec obturateurs
15 actionnables par l'extérieur et situés uniquement dans leur épaisseur et sur leur tranche,
lesdits modules élémentaires plats (1) étant pourvus enfin de microcanaux (41) orientés
parallèlement à leur surface, lesdits microcanaux (41) débouchant dans l'épaisseur et sur
la tranche d'un côté au moins desdits modules élémentaires plats (1) et pouvant de ce fait
être reconvertis en micro-puits (42) profonds et étroits, de sorte qu'une ligne (2119)
20 desdits micro-puits (42) est constituée sur la tranche dudit côté dudit module élémentaire
plat (1), et que l'empilement de plusieurs desdits modules élémentaires plats (1) crée une
juxtaposition de lignes (2119) desdits micropuits (42) et crée par conséquent ledit micro-
array ou macro-array multibloc (3119) tout entier, le nombre desdits modules
élémentaires plats (1) empilés constituant le nombre de lignes dudit micro-array ou
macro-array (3119), et le nombre desdits micro-canaux (41) par module élémentaire plat
25 (1) constituant le nombre de colonnes dudit micro-array ou macro-array multibloc (3119),
lesdits micro-arrays ou macroarrays multiblocs (3119) pouvant être interconnectés
orthogonalement deux à deux, de manière à ce que l'empilement de modules plats
élémentaires (1) constituant le premier micro-array ou macro-array multibloc soit décalé
par une rotation de 90° autour de l'axe des micro-canaux (41) par rapport à l'empilement
30 des modules élémentaires plats (1) du deuxième micro-array ou macro-array multibloc,
de manière à offrir la possibilité d'un parallélisme massif des réactions par configuration
de matrices XY où des lignes de premiers réactifs (x_1 x_2 .. x_n) dans le premier micro-
array ou macro-array multibloc se croisent avec des lignes de deuxièmes réactifs
spécifiques (y_1 y_2 ... y_n) dans le deuxième micro-array ou macro-array multibloc.
- 35 2- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" (3119) selon la revendication 1, caractérisés en ce que
les modules plats (1) ont des microcanaux (41) d'une longueur de quelques millimètres à
quelques centimètres, et une section de très petit diamètre, de l'ordre de 5 à 500 microns,
de forme arrondie ou rectangulaire ou en ligne brisée.
- 40 3- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" (3119) selon la revendication 1, caractérisés en ce que
leur géométrie est assurée par des encoches portées par lesdits modules élémentaires plats
(1) et par des contenants épousant leur forme.
- 45 4- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" (3119) selon la revendication 1, caractérisés en ce que
les modules élémentaires plats (1) comportent des microcanaux (41) pourvus de micro-

micro-array ou macro-array- multibloc (3119) avec un autre liquide arrivant de manière interne par le dessous dudit micro-array ou macro-array multibloc (3119).

- 5- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" (3119) mâles (femelles) selon la revendication 1, caractérisés en ce que les micro-canaux (41) peuvent déboucher dans l'épaisseur et sur la tranche d'au moins un côté desdits modules élémentaires plats (1) à l'endroit de zones convexes (cocaves), pouvant s'accoupler avec la forme femelle (mâle) complémentaire.
- 6- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" (37119) femelles selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par un empilement de modules plats (37100) formant un parallélépipède dont l'une des faces constitue ledit micro-array ou macro-array (37119) et dont une autre face se connecte à un élément plat (47000) de préparation des échantillons et réactifs puis de répartition d' aliquots sur des micro-emplacements (47107), chacun desdits aliquots étant repris par un desdits modules plats (37110) à partir d'une chambre de réception (37164), puis à nouveau aliquoté et dirigé vers les micro-puits ou micro-emplacements (37042) dudit micro-array ou macro-array multibloc (37119).
- 7- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs (319) selon la revendication 1, caractérisés en ce que les modules élémentaires plats (110) sont pourvus d'une zone de préparation des réactifs et des échantillons avant leur envoi dans les microcanaux (41), ladite zone étant intégrée dans une circuiterie microfluidique (55) et pouvant comprendre une zone de filtration (25) avec filtres (16), une zone de purification (35) comportant une ou plusieurs microcolonnes (17), et une zone de traitement d'un réactif ou d'un échantillon filtré et purifié (45), lesdites zones étant sous le contrôle d'obturateurs positionnés dans l'épaisseur et sur la tranche desdits modules élémentaires plats (110), lesdits obturateurs pouvant être actionnés par l'extérieur.
- 8- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs (319) selon la revendication 1, caractérisés en ce que les modules élémentaires plats (110) sont constitués de deux au moins sous-parties détachables (145) et (155), ladite sous-partie détachable (145) supportant tout ou partie des microcanaux (41) et pouvant être de très faible épaisseur, de l'ordre de 20 à 800 microns et ladite sous-partie détachable (155) supportant tout ou partie des composants de plus grande section.
- 9- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs (319) selon les revendications 1, 7, et 8, caractérisés en ce que les modules élémentaires plats (110) sont d'une part pourvus d'une circuiterie électrique (391) chargée d'activer des micro-électrodes ou des micro-composants utilisés dans ladite circuiterie microfluidique (55) et dans les micro-canaux (41), d'autre part pourvus de plots de connexion électrique (390) et (380) situés dans l'épaisseur et sur la tranche respectivement desdites sous-parties (155) et (145) desdits modules élémentaires plats (110) de manière à connecter lesdites sous-parties desdits modules élémentaires plats à une alimentation électrique.
- 10- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs (319) selon la revendication 1, caractérisés en ce que les sous-parties détachables (145) desdits modules élémentaires plats (110) peuvent être séparées des sous-parties (155) puis empilées, de manière à former un

micro-array ou un macro-array multibloc (318) de densité supérieure, du fait que lesdites sous-parties détachables (145) ont une plus faible épaisseur que les sous-parties (155).

- 5 11- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs (3119) selon la revendication 1, caractérisés en ce que deux "micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs (3119) peuvent se connecter face à face, de telle manière que soit assuré de manière étanche et à l'abri des contaminations le mélange de fluides et de réactifs d'un premier micro-array ou macro-array multibloc (3119) avec les fluides et réactifs d'un deuxième micro-array ou macro-array multibloc (3119), ledit mélange ayant lieu en partie dans les micromélangeurs (19),
10 et de telle manière que soient assurées les réactions chimiques, biochimiques ou biologiques désirées sur de très petits volumes contenus dans les portions de micro-canaux (41) dans lesquelles s'effectuent les réactions.
- 15 12- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs (3119) selon la revendication 11, caractérisés en ce que deux "micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs (3119) ayant été connectés face à face peuvent être déconnectés après que les réactions chimiques désirées aient eu lieu, de telle manière qu'on puisse disposer de l'un ou l'autre ou des deux micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (3119), chacun des deux ayant tout ou partie des
20 produits de réactions désirés.
- 25 13- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs (319) selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils peuvent se connecter orthogonalement à un empilement de modules élémentaires plats (946, 9046), eux-mêmes connectés directement à un empilement de modules élémentaires plats (910, 9010) munis d'un ou plusieurs compartiments (956, 9056).
- 30 14- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs (319) selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils peuvent se connecter directement à un empilement de modules élémentaires plats (1046, 10046), eux-mêmes connectés orthogonalement à un empilement de modules élémentaires plats (1010, 10010) munis d'un ou plusieurs compartiments (1056, 10056).
- 35 15- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs (4319) selon la revendication 8, caractérisés en ce que les modules élémentaires plats (4110) sont pourvus de deux sous-parties (4145) et (4155), ladite sous-partie (4155) ménageant un espace important entre lesdits micro-canaux (41), ladite sous-partie (4145) recevant lesdits micro-canaux (41) dans une configuration resserrée, l'empilement desdits modules élémentaires plats (4110) constituant des micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (4319) dont le niveau de densité est dû au resserrement desdits micro-canaux (41) sur ladite sous-partie (4145), et
40 l'empilement desdites sous-parties (4145) constituant des micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (4318) dont le niveau encore supérieur de densité est dû à la moindre épaisseur desdites sous-parties détachables (4145).
- 45 16- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs (3119) selon la revendication 1, caractérisés en qu'ils se connectent à une pièce d'aplanissement monobloc (555) desdits "microarrays" ou "macro-arrays multiblocs" (3119) mâles, ladite pièce d'aplanissement

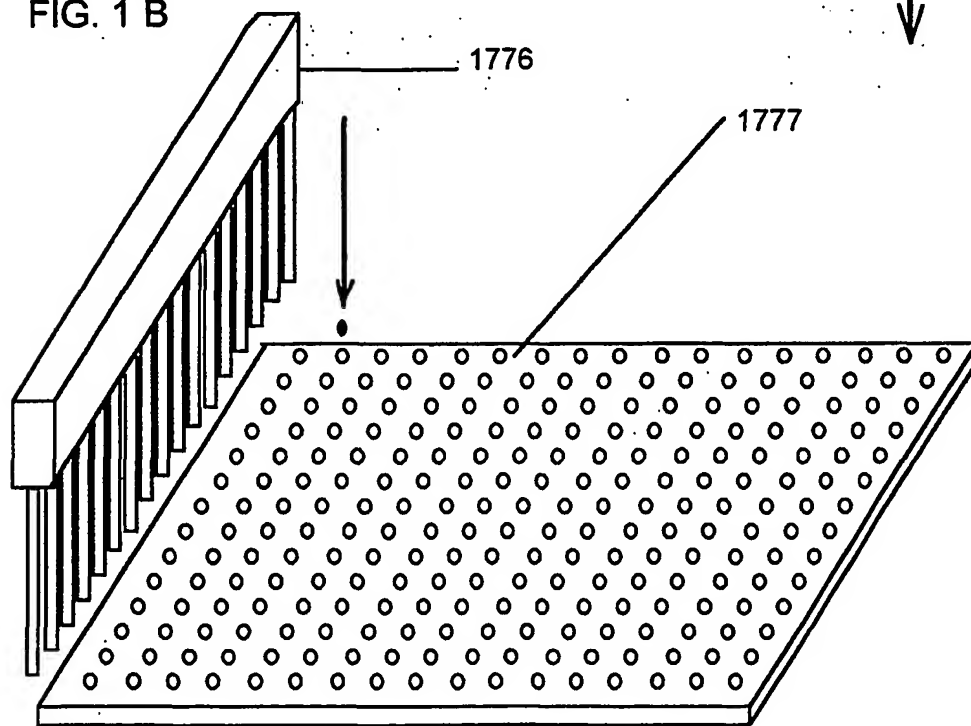
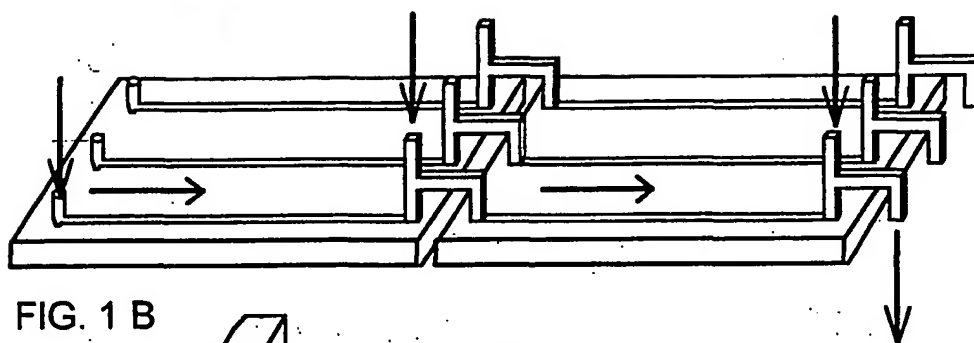
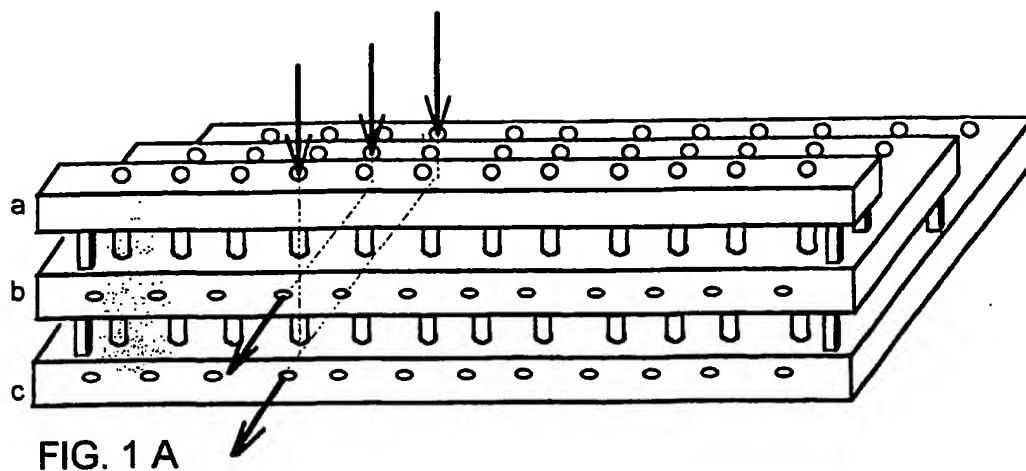
présentant au recto une face plane, et au verso son autre face qui s'emboîte dans ledit "micro-array" ou "macro-array" (3119) mâle.

- 5 17- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs (3119) selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils se connectent à une pièce (340) monobloc et plane formant un microarray de bouchons qui viennent obturer les micro-puits (42) desdits micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (3119).
- 10 18- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs (3119) selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils se connectent à une pièce monobloc de fixation de molécules pourvue d'un "array" de micro-puits ou de spots dont le quadrillage est calqué sur celui dudit "micro-array" ou "macro-array" multibloc (3119) offrant dans chacun de ses micro-puits ou sur chacun de ses spots une surface de fixation à une molécule utile dans un process d'analyse chimique ou biochimique ou biologique.
- 15 19- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs (3119) selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'une pièce de fixation et de synthèse en phase solide de molécules est plane, monobloc, connectable à un "micro-array" ou un "macro-array" multibloc (3119), pourvue d'un "array" de micro-puits dont le quadrillage est calqué sur celui dudit "micro-array" ou "macro-array" multibloc (3119), offrant dans chacun de ses micro-puits une surface de fixation à une molécule à synthétiser dans un process de synthèse en phase solide.
- 20 20- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs (3119) selon l'une quelconque des revendications 1 à 19, caractérisés en ce que tous les modules élémentaires plats, micro-composants compris ou non, sont fabriqués avec les techniques de microfabrication selon un assemblage par superposition et fusion de sous-parties planes complémentaires.
- 25 21- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs (3119) selon l'une quelconque des revendications 1 à 19, caractérisés en ce que les surfaces desdits "micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs sont micro-usinées ou soumises à un travail de finition avec les mêmes techniques de microfabrication que s'il s'agissait d'une surface plane d'un seul tenant, c'est à dire essentiellement des techniques de découpage, de gravure sèche ou gravure humide par photolithographie, d'ablation laser, d'assemblage ou collage par fusion ou d'assemblage anodique, de forage, d'estampage, de soudure, d'électrodéposition, d'électroless plating ou de dépôt de vapeur chimique.
- 30 22- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs (3119) selon l'une quelconque des revendications 1 à 19, caractérisés en ce que les surfaces desdits "micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs, pourvus d'une pièce d'aplanissement (555) sont micro-usinées ou soumises à un travail de finition avec les mêmes techniques que s'il s'agissait d'une surface plane d'un seul tenant.
- 35 23- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs (3119) selon la revendication 1, caractérisés en ce que les modules élémentaires plats ont un côté au moins en forme d'arc de cercle, lesdits modules élémentaires plats étant pourvus de micro-canaux débouchant dans l'épaisseur et sur la tranche dudit côté en arc de cercle, l'empilement
- 40 45

des modules élémentaires plats ainsi constitué ayant une face dont la surface épouse la forme d'un cylindre et étant adapté à une connexion avec des éléments homologues pour une détection à partir d'un détecteur rotatif

- 5 24- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs (3119) selon la revendication 23, caractérisés en ce qu'ils sont constitués d'empilements décalés de modules élémentaires plats dont un côté au moins a une forme en arc de cercle, lesdits modules élémentaires plats étant pourvus de micro-canaux débouchant dans l'épaisseur et sur la tranche dudit côté en arc de cercle, ledit empilement décalé ainsi étant adapté à une connexion avec des
10 éléments homologues pour une détection à partir d'un détecteur rotatif
- 25- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs (3119) selon la revendication 1, caractérisés en ce que chaque micro-puits est adressé individuellement par des fibres optiques, lesdites fibres optiques assurant la détection des produits de réaction, ou
15 contrôlant des réactions électro-cinétiques ou l'aggrégation de micro-particules ou de molécules dans ledit micropuits, ou dirigeant une photoexposition dans ledit micro-puits dudit micro-array ou macro-array multibloc.
- 26- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs (3119) selon la revendication 1, caractérisés en ce que chaque micro-puits est adressé individuellement par des électrodes, lesdites électrodes devant contrôler la réaction en cours dans chaque micro-puits dudit
20 micro-array ou macro-array multibloc.
- 27- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs (3119) selon les revendications 1, 5, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 23, 24, caractérisés en ce que l'étanchéité de connexion entre deux desdits micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (3119) est assurée par l'emploi de polymères, soit par l'emploi de polymères pour fabriquer dans la masse les modules plats constituant l'empilement desdits micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (3119), soit par
25 revêtement avec un polymère de la tranche de chacun desdits modules plats constituant l'empilement, soit par l'usage d'une pièce intermédiaire monobloc en polymère faisant office de joint entre deux desdits micro-arrays ou macro-arrays multiblocs (3119).
- 28- "Micro-arrays" ou "macro-arrays" multiblocs selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'un marquage de chaque module plat devant être inclus dans la constitution d'un micro-array de l'invention dédié à un échantillon ou à une opération spécifique permet la recomposition d'empilements de modules plats ayant reçu des réactifs spécifiques dans
35 d'autres empilements.

1 / 42



2 / 42

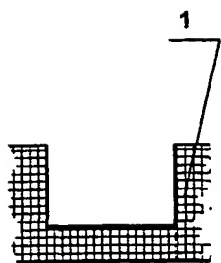


FIG. 2 A

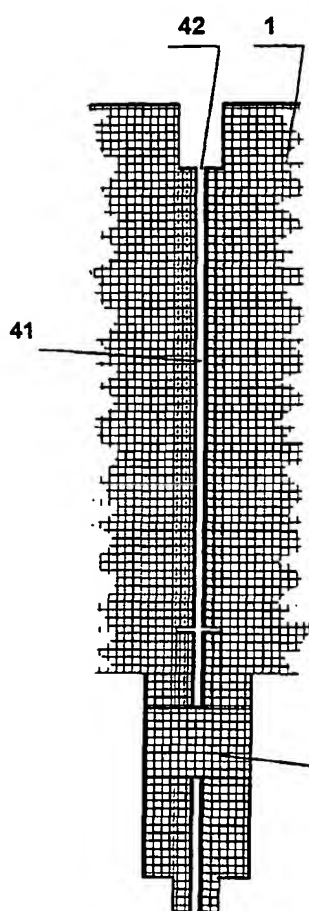


FIG. 2 B

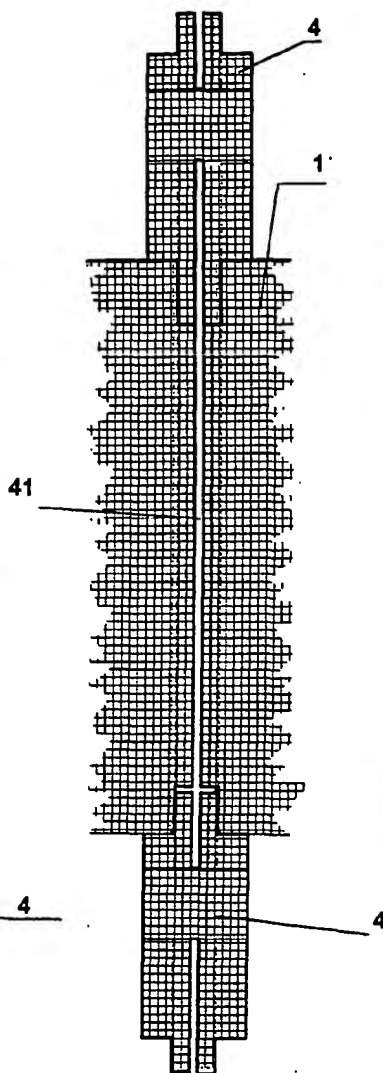


FIG. 2 C

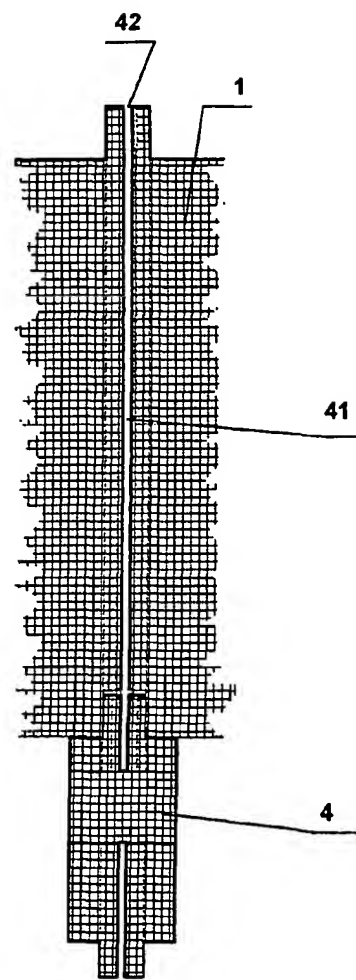


FIG. 2 D

3 / 42

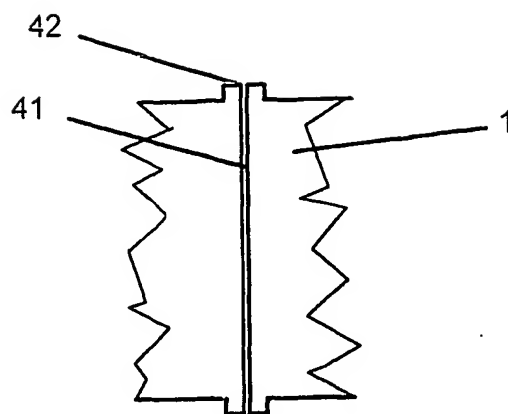


FIG. 3 A

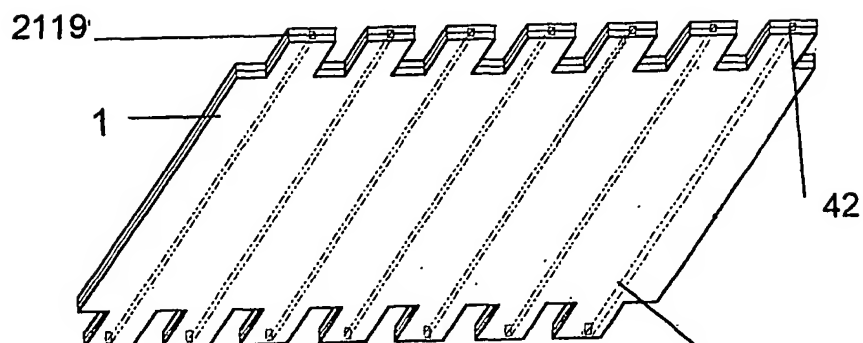


FIG. 3 B

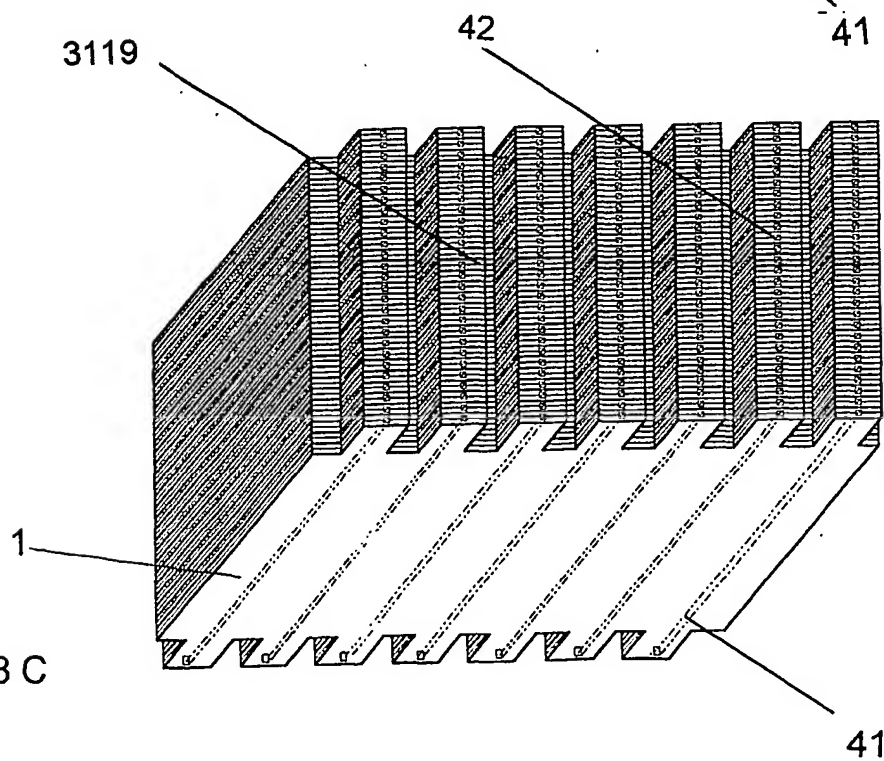


FIG. 3 C

4 / 42

FIG. 4 A

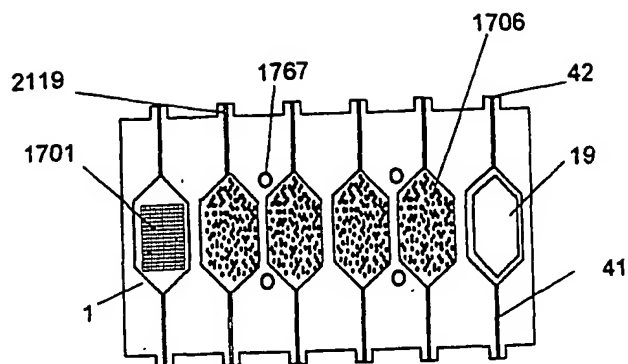


FIG. 4 B

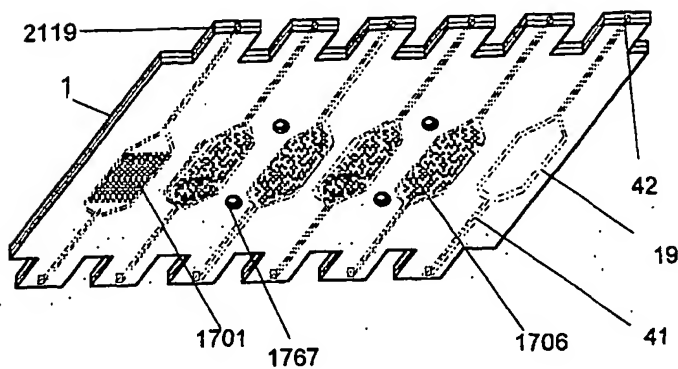
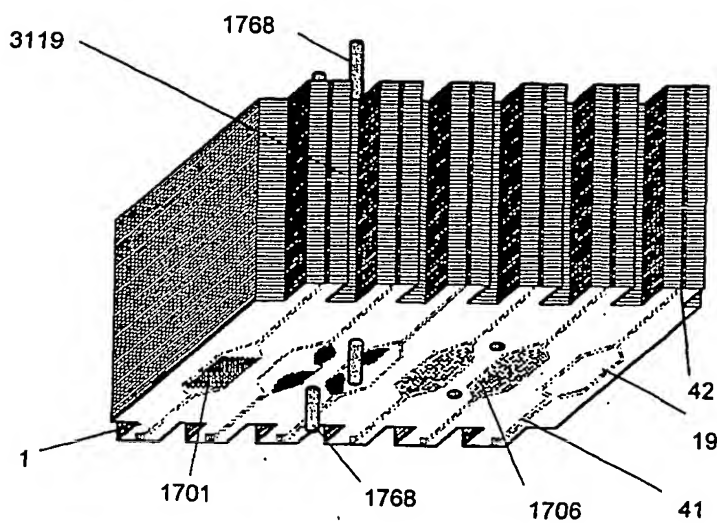


FIG. 4 C



5 / 42

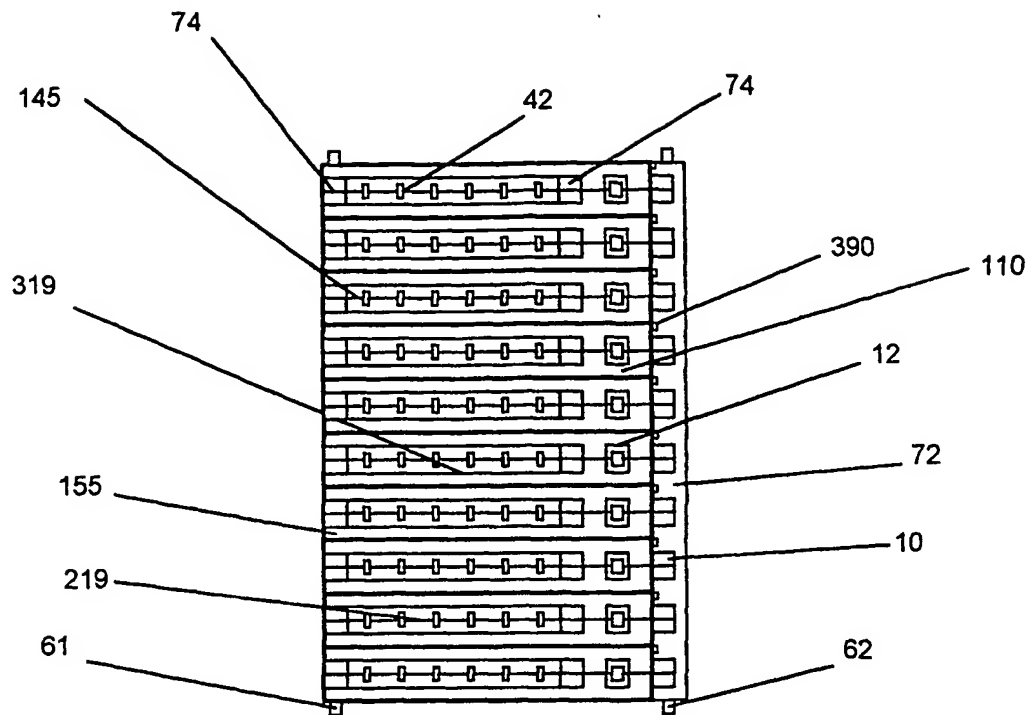


FIG. 5

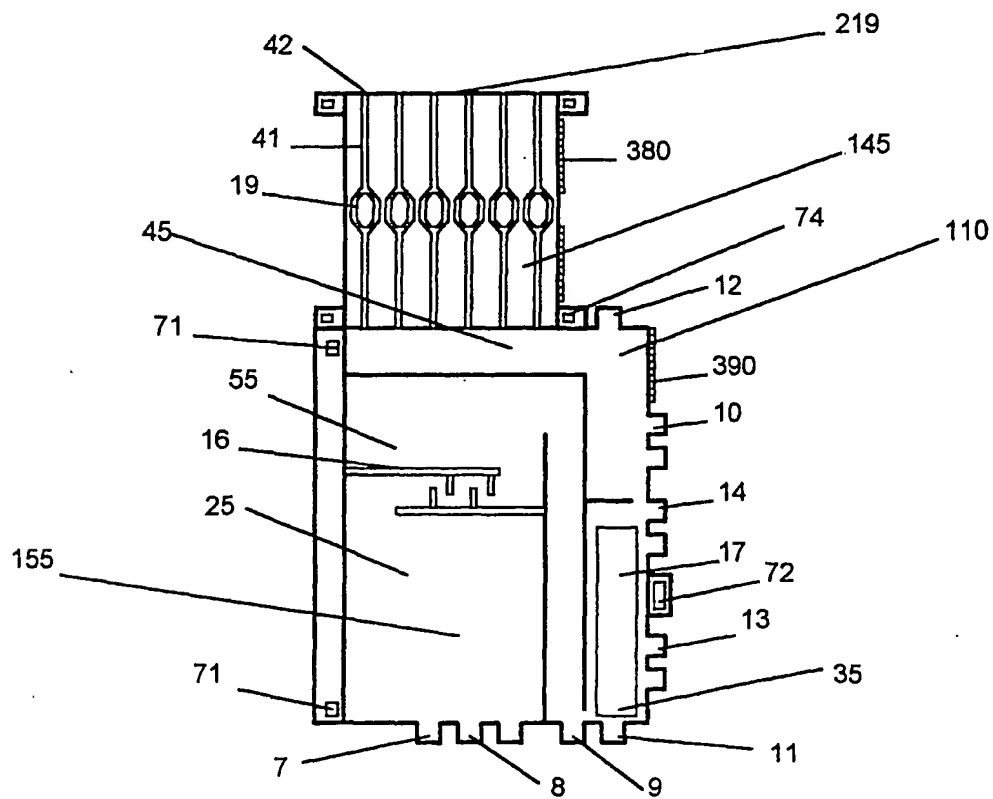
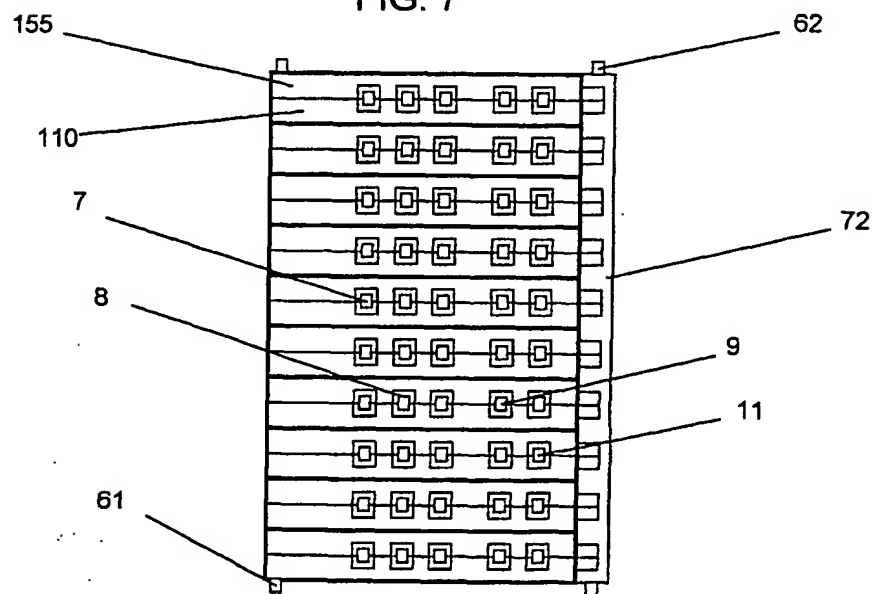
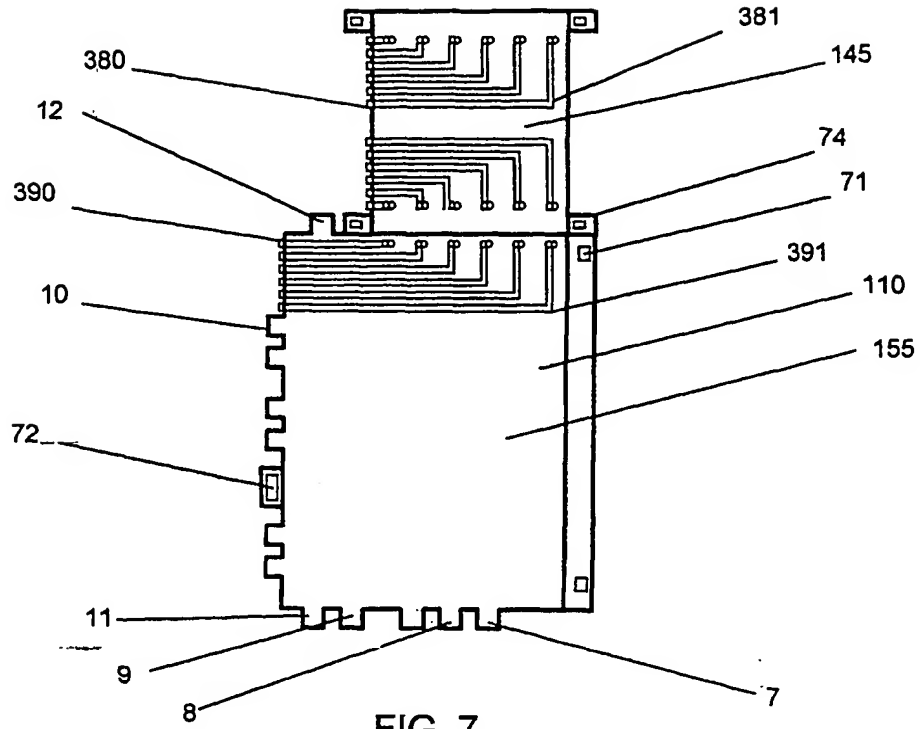


FIG. 6



7 / 42

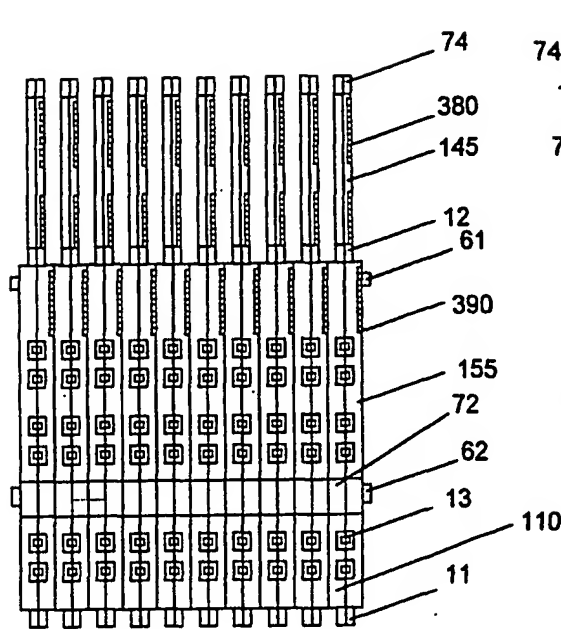


FIG. 9

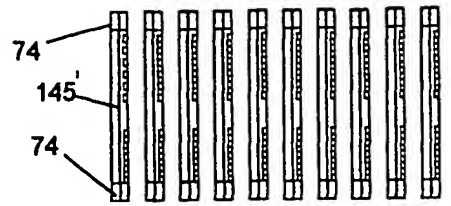


FIG. 10

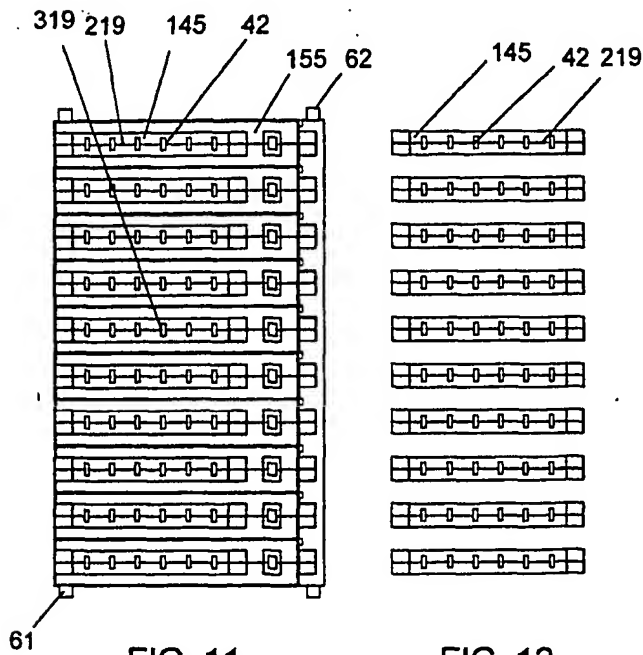


FIG. 11

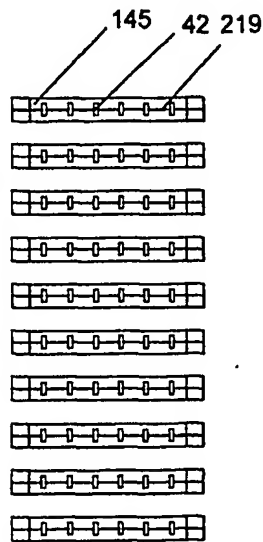


FIG. 12

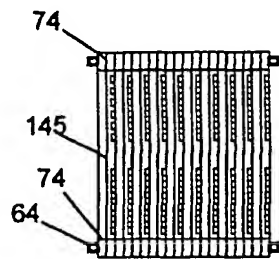


FIG. 13

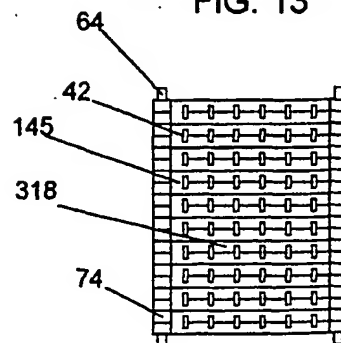


FIG. 14

8 / 42

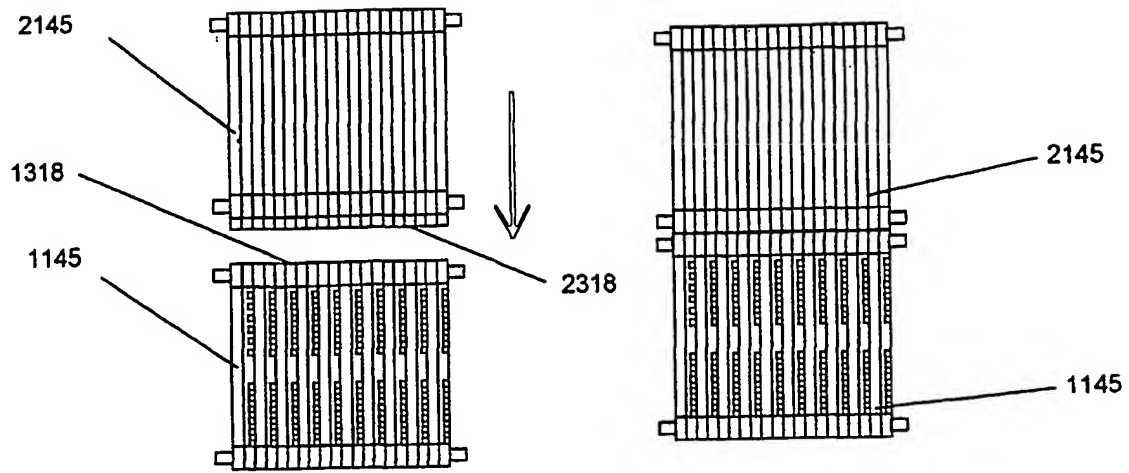


FIG. 15

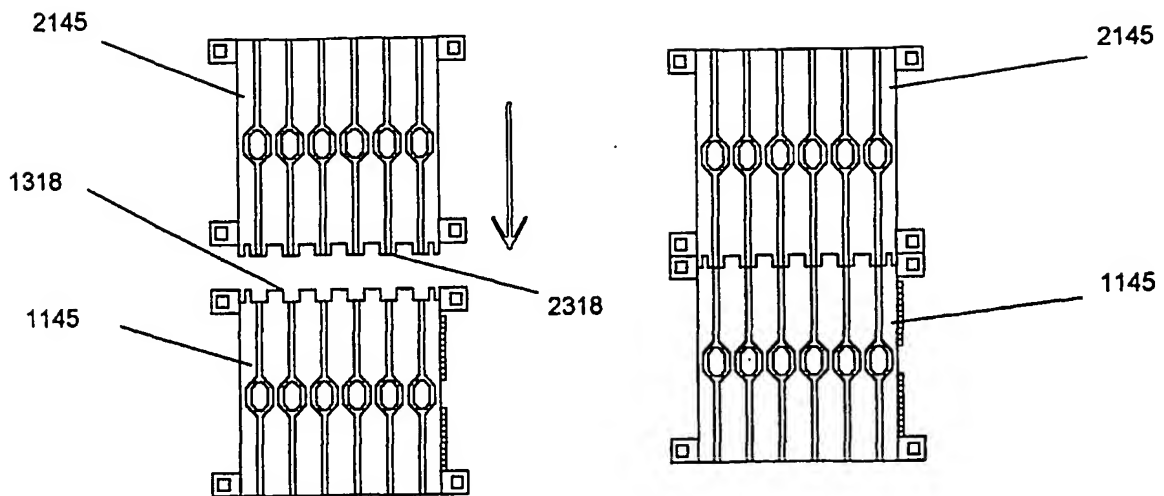


FIG. 16

9 / 42

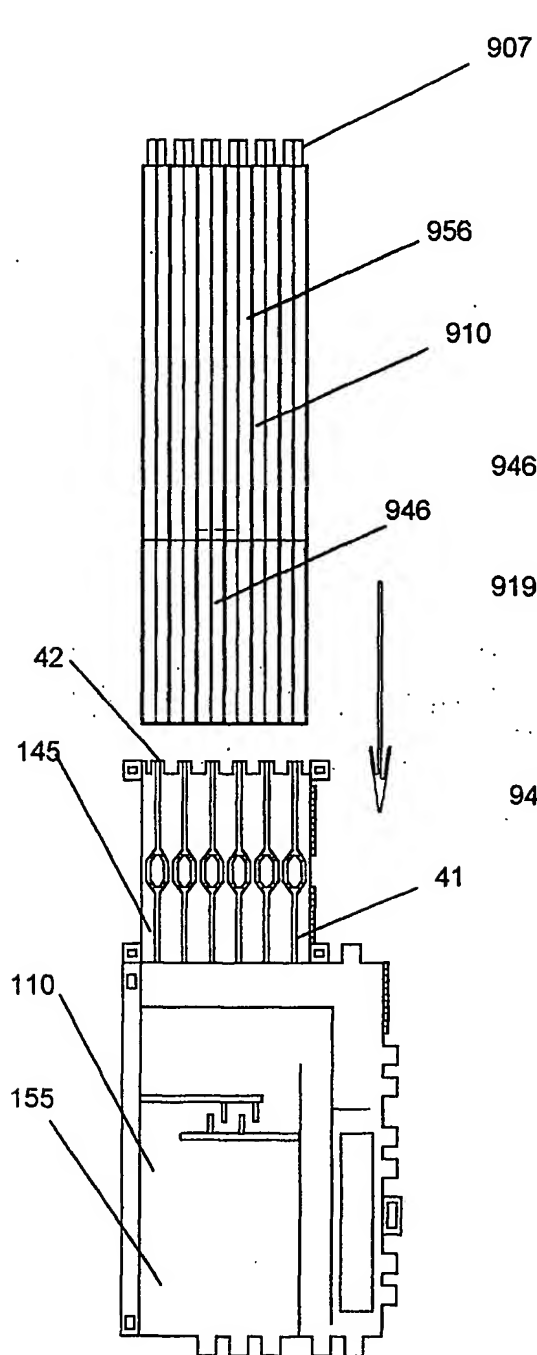


FIG. 17

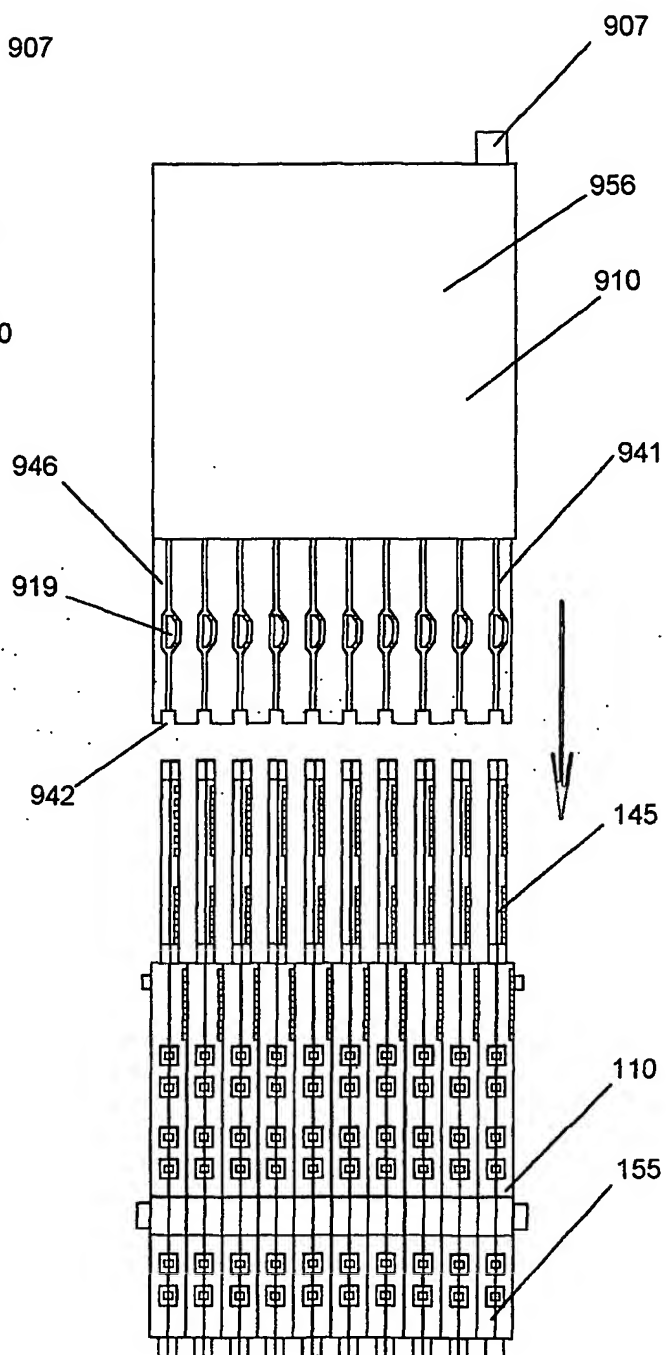


FIG. 18

10 / 42

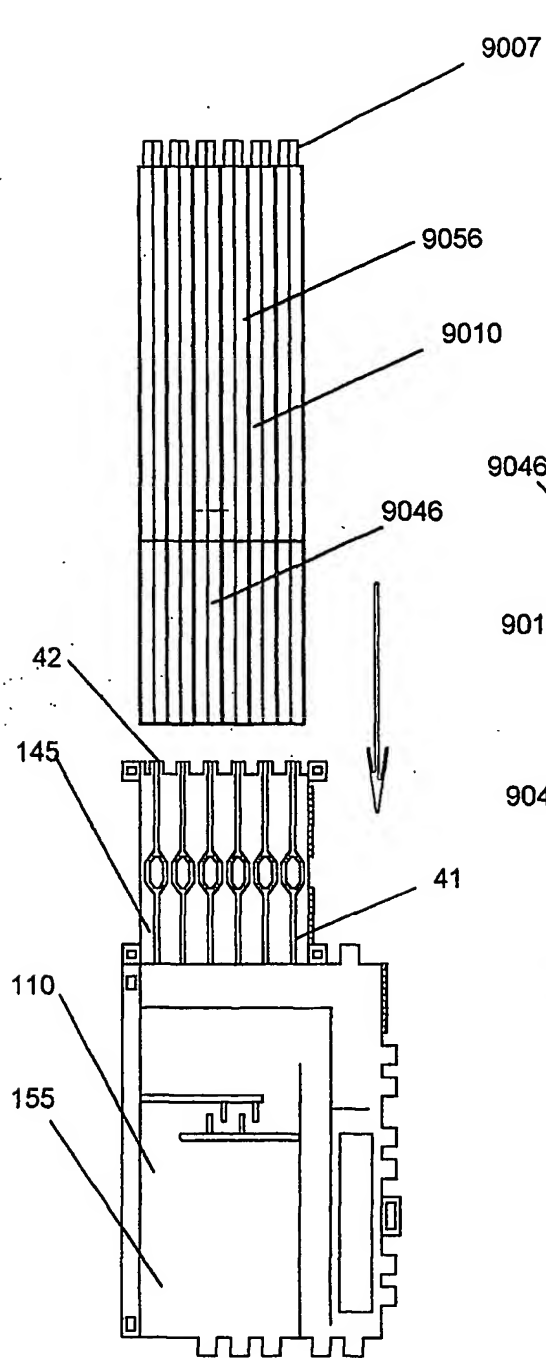


FIG. 19

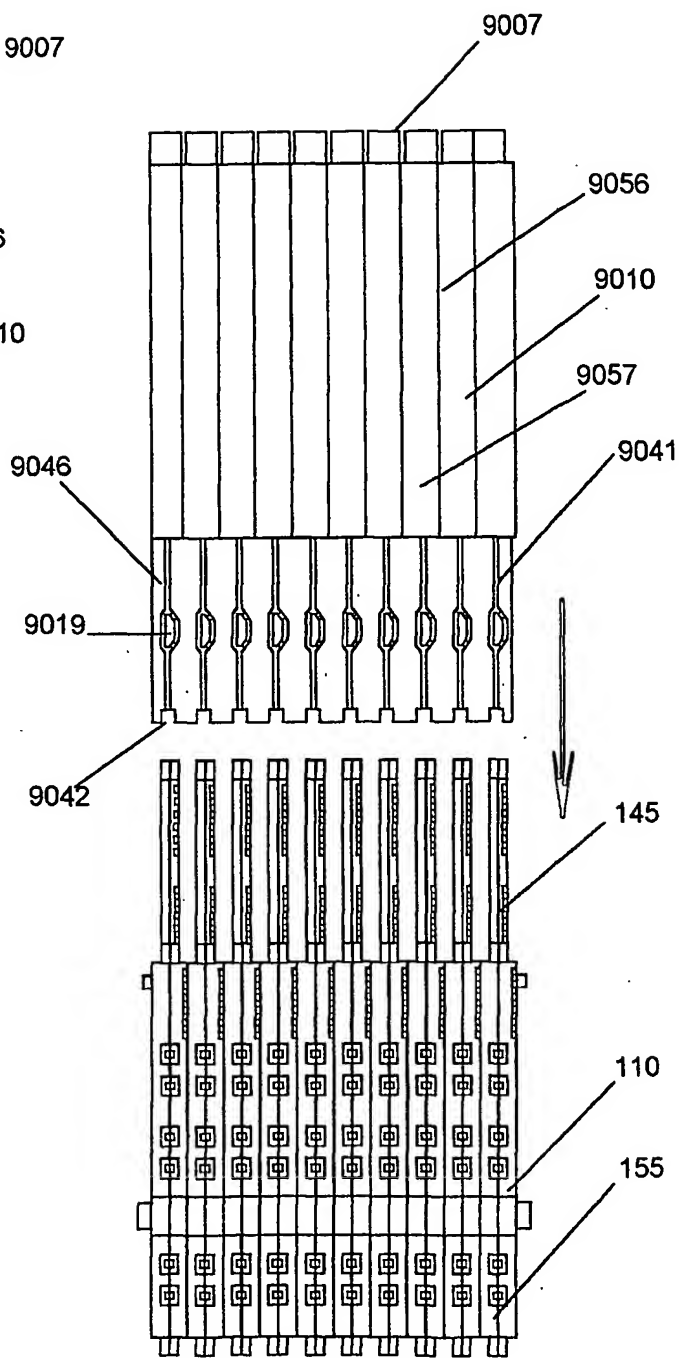


FIG. 20

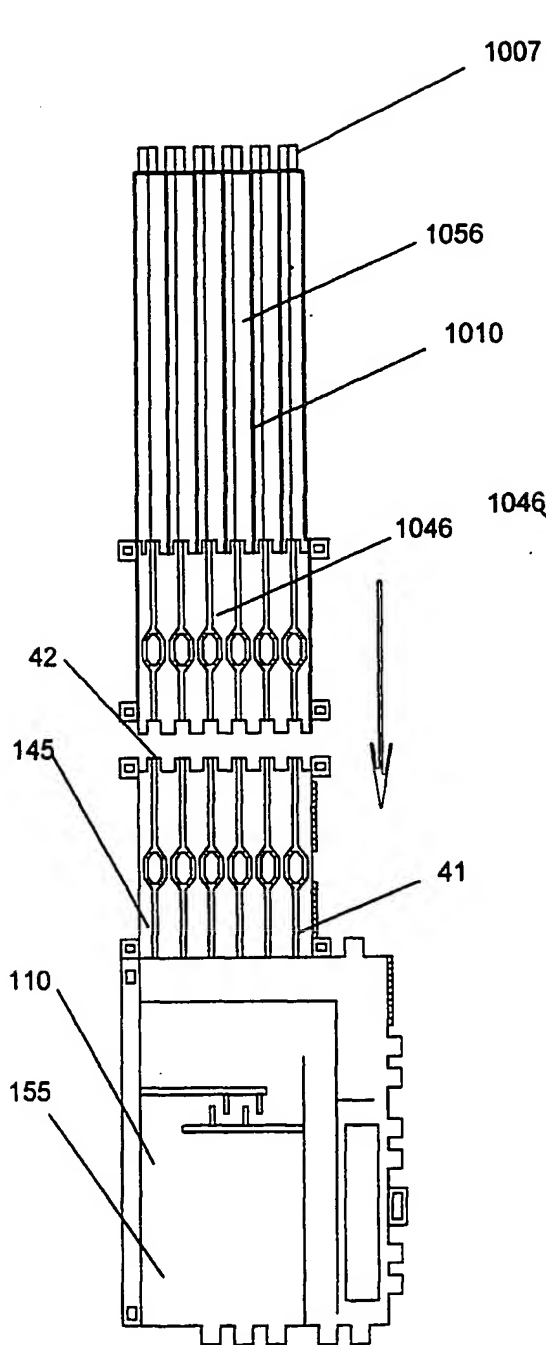


FIG. 21

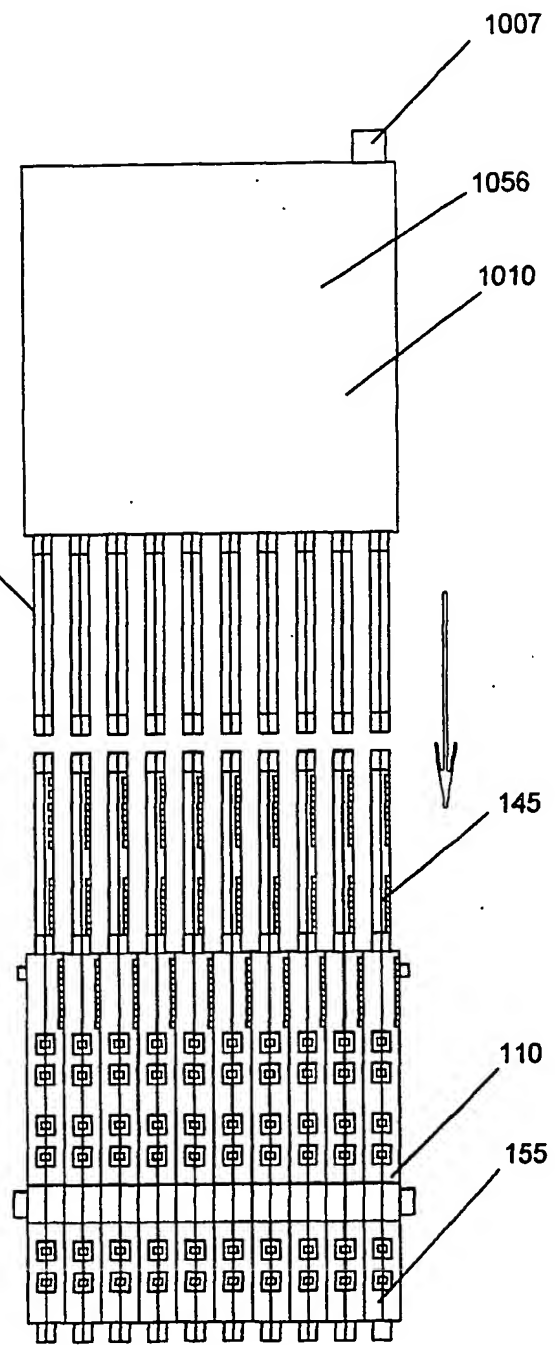


FIG. 22

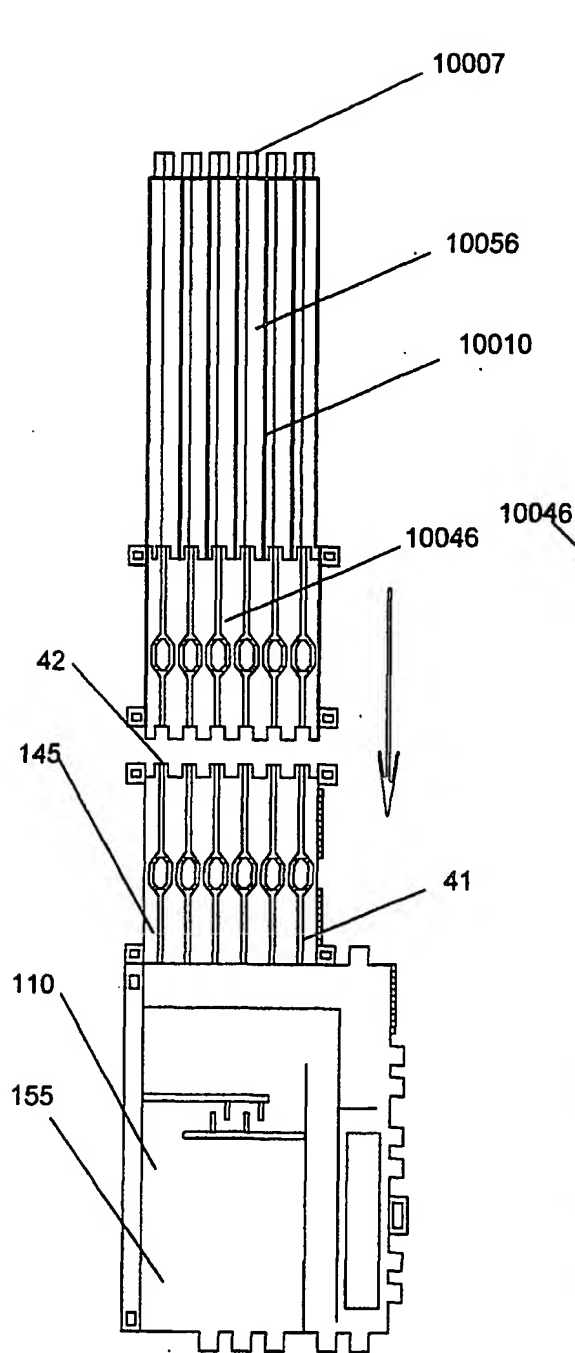


FIG. 23

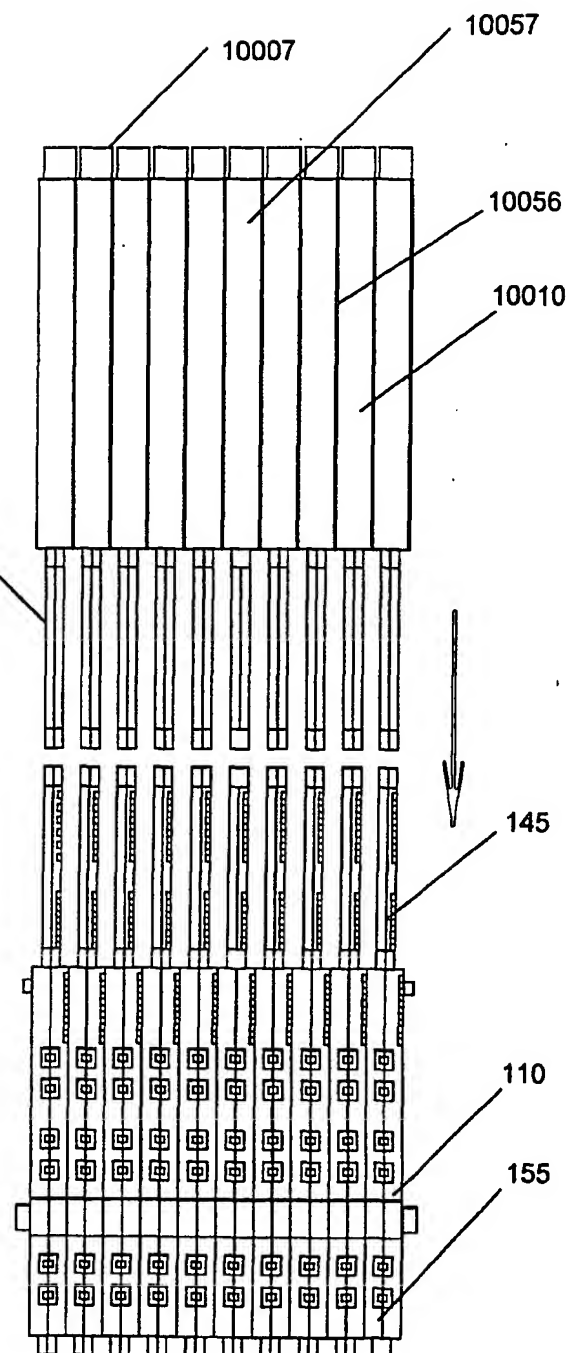


FIG. 24

13 / 42

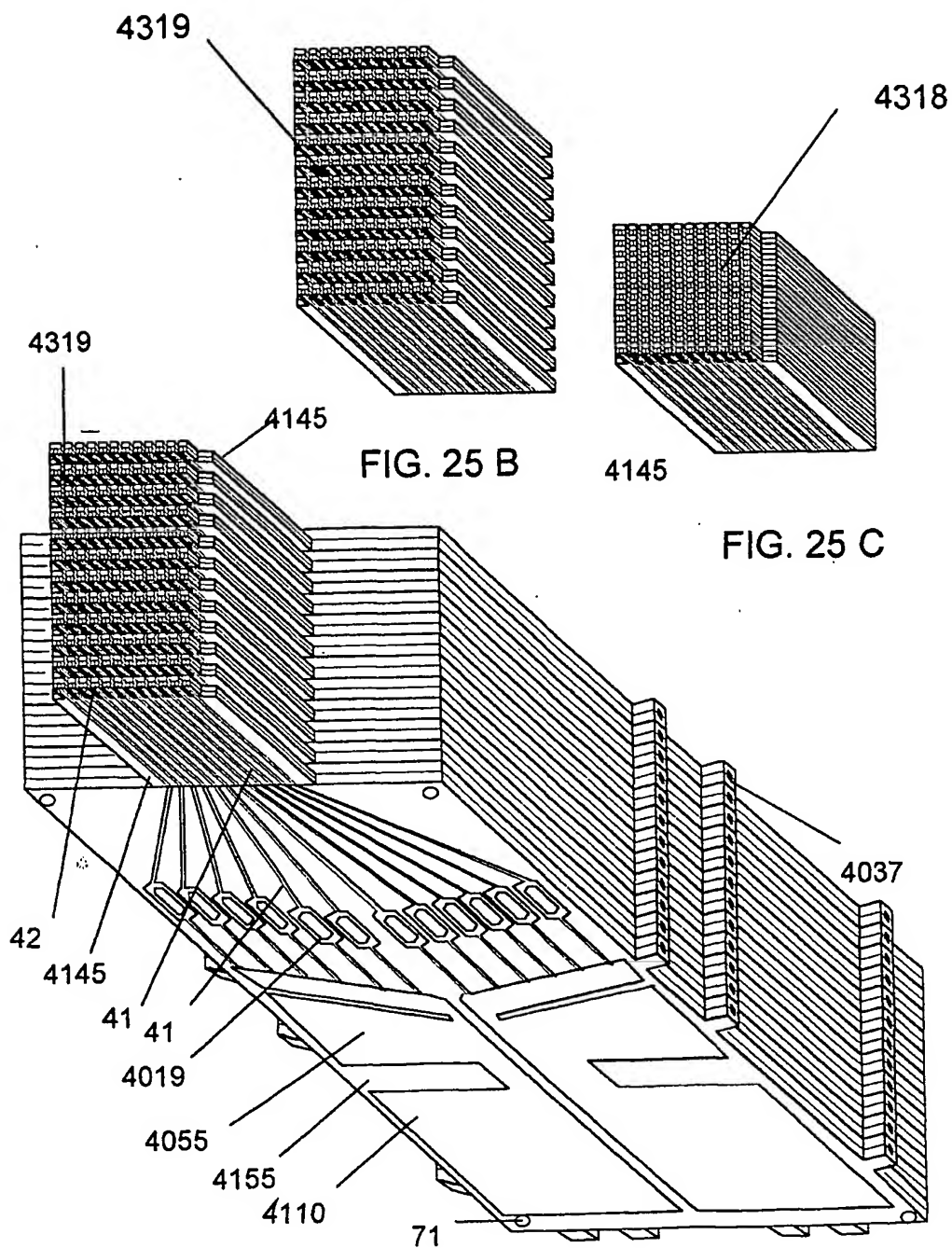


FIG. 25 A

14 / 42

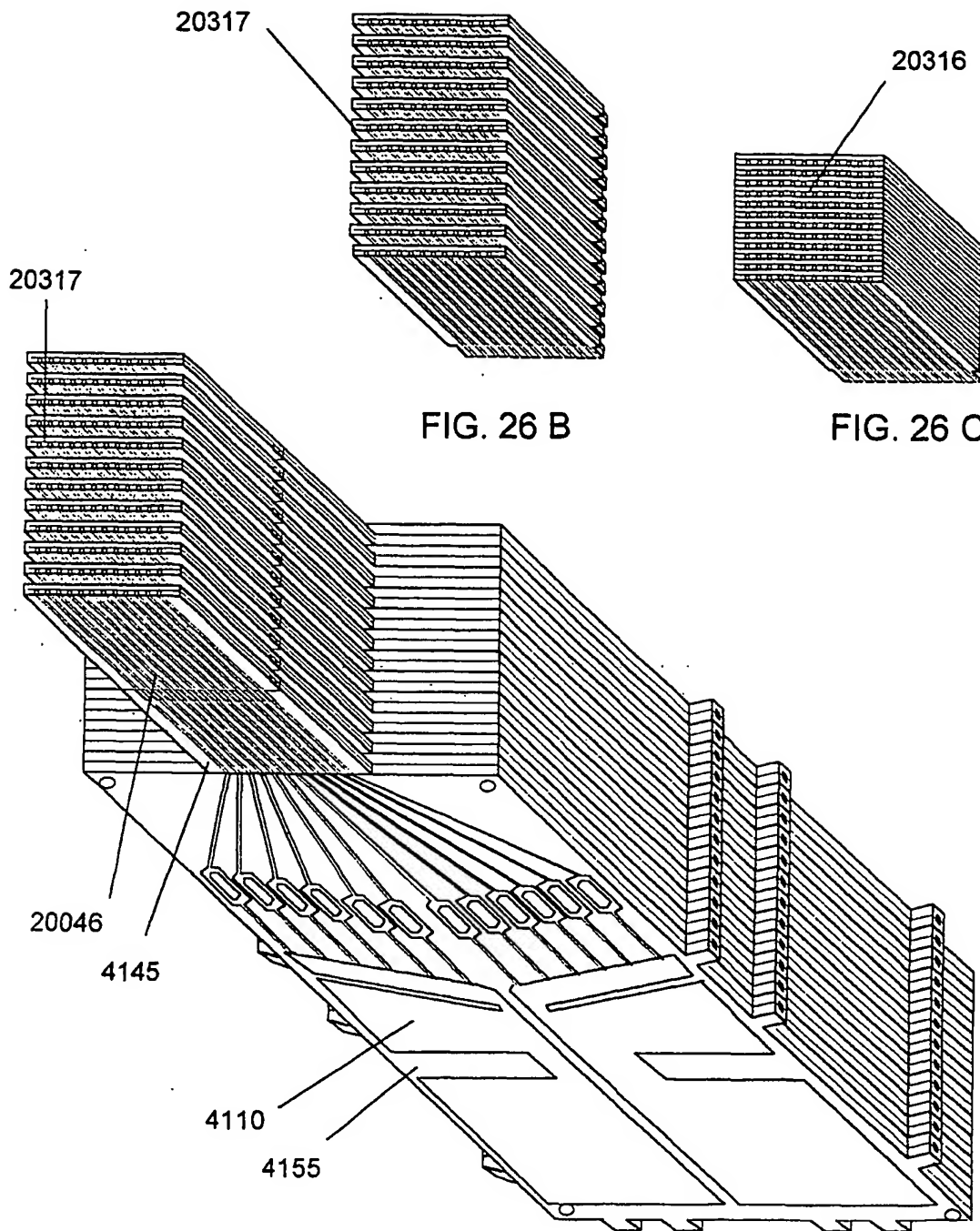


FIG. 26 B

FIG. 26 C

FIG. 26 A

15 / 42

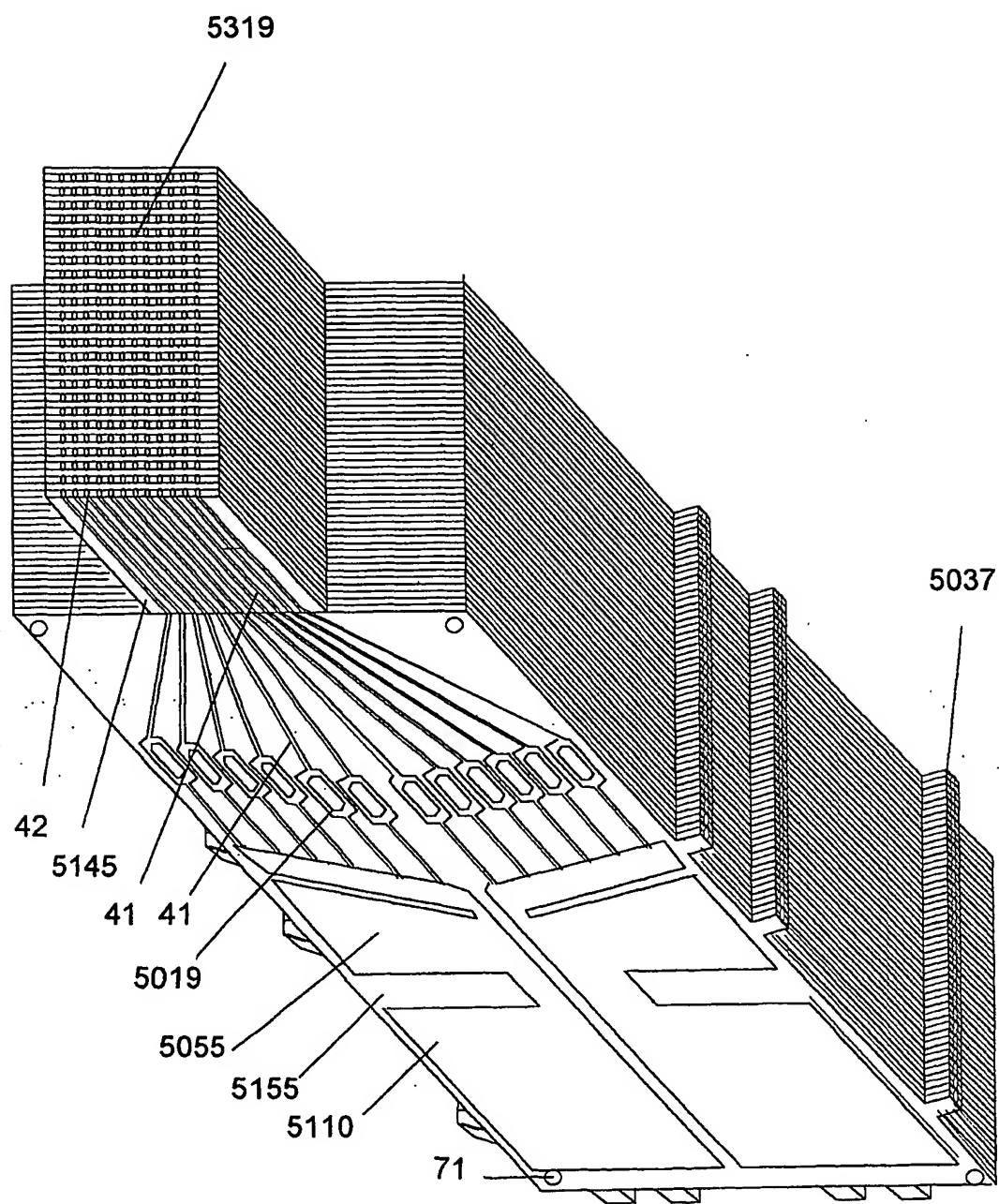
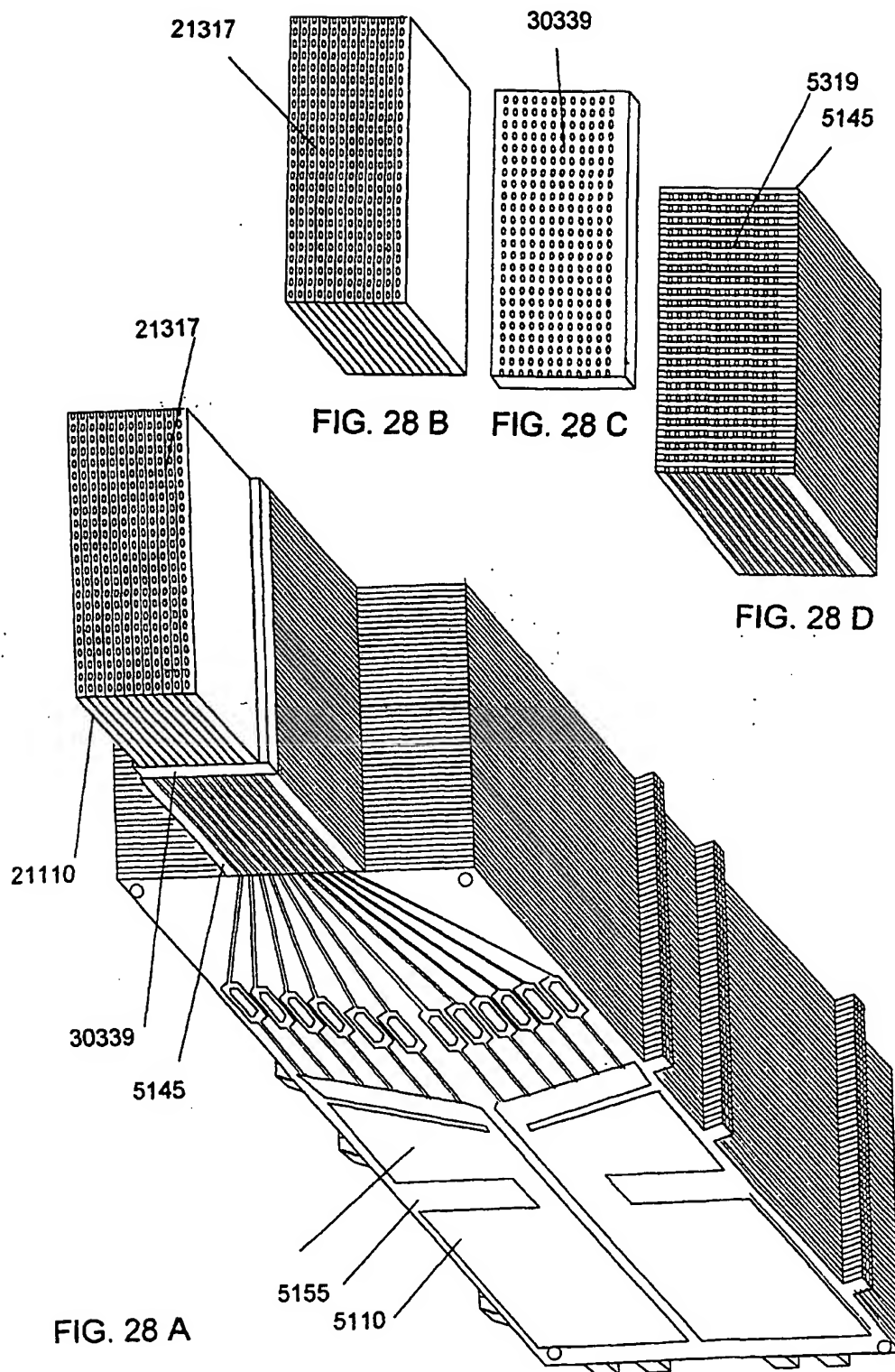


FIG. 27



17 / 42

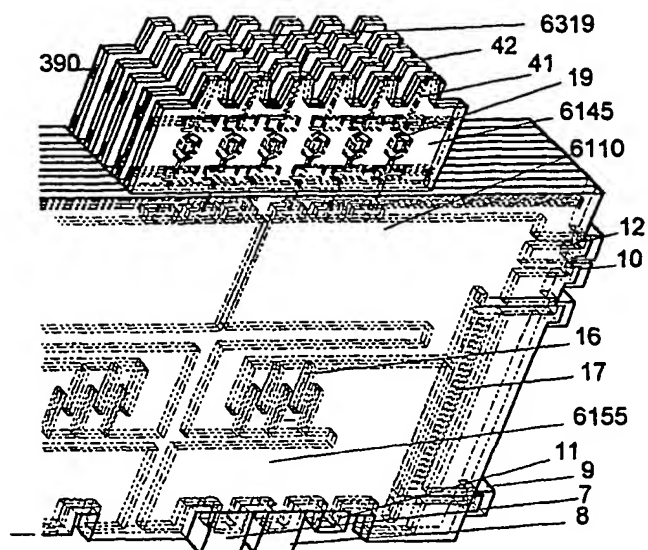


FIG 29 A

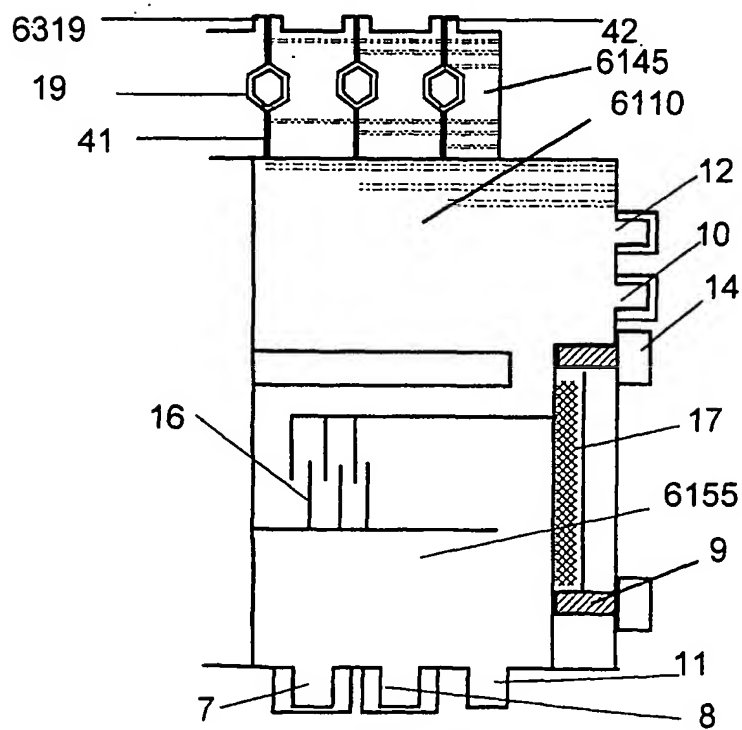


FIG. 29 B

18 / 42

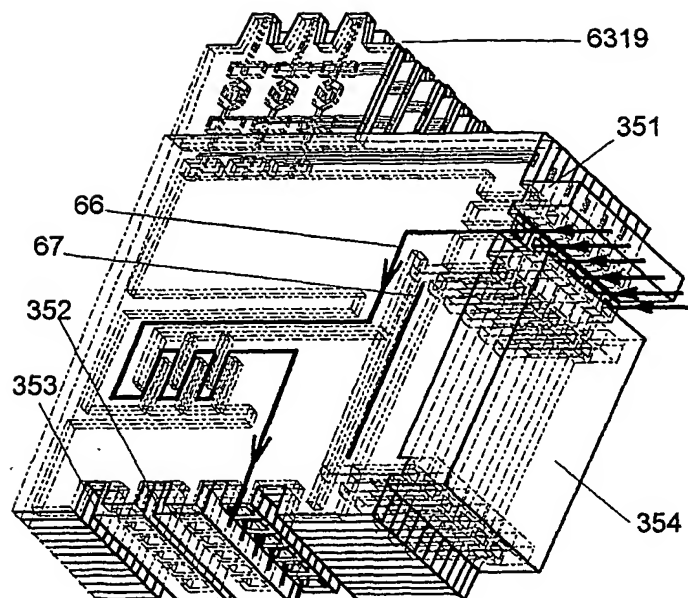


FIG. 30 A

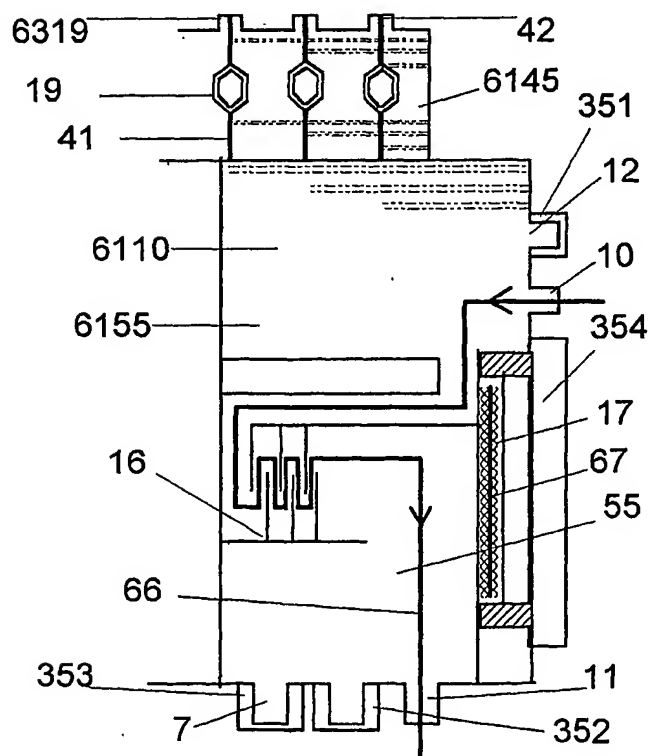


FIG. 30 B

19 / 42

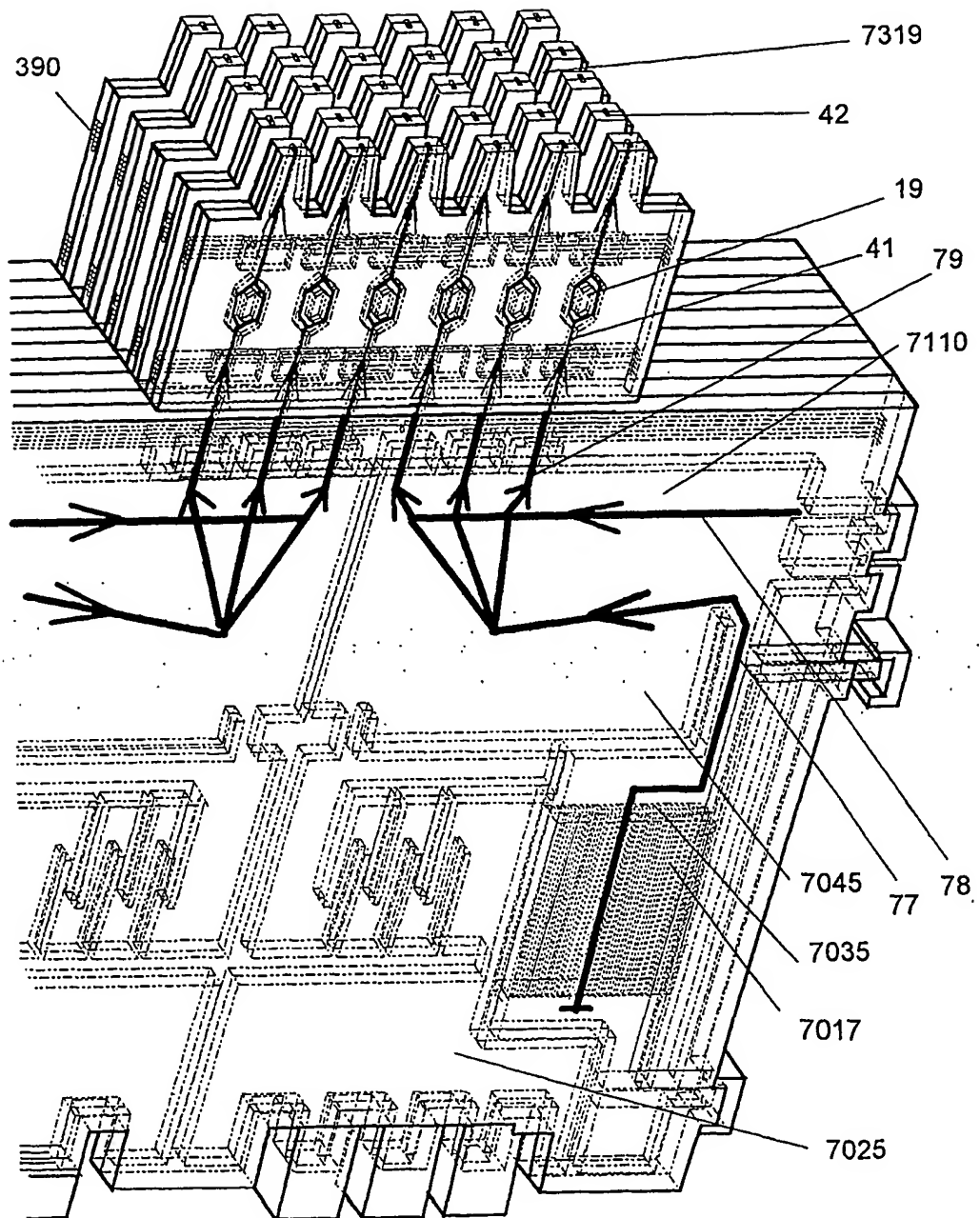


FIG. 31

20 / 42

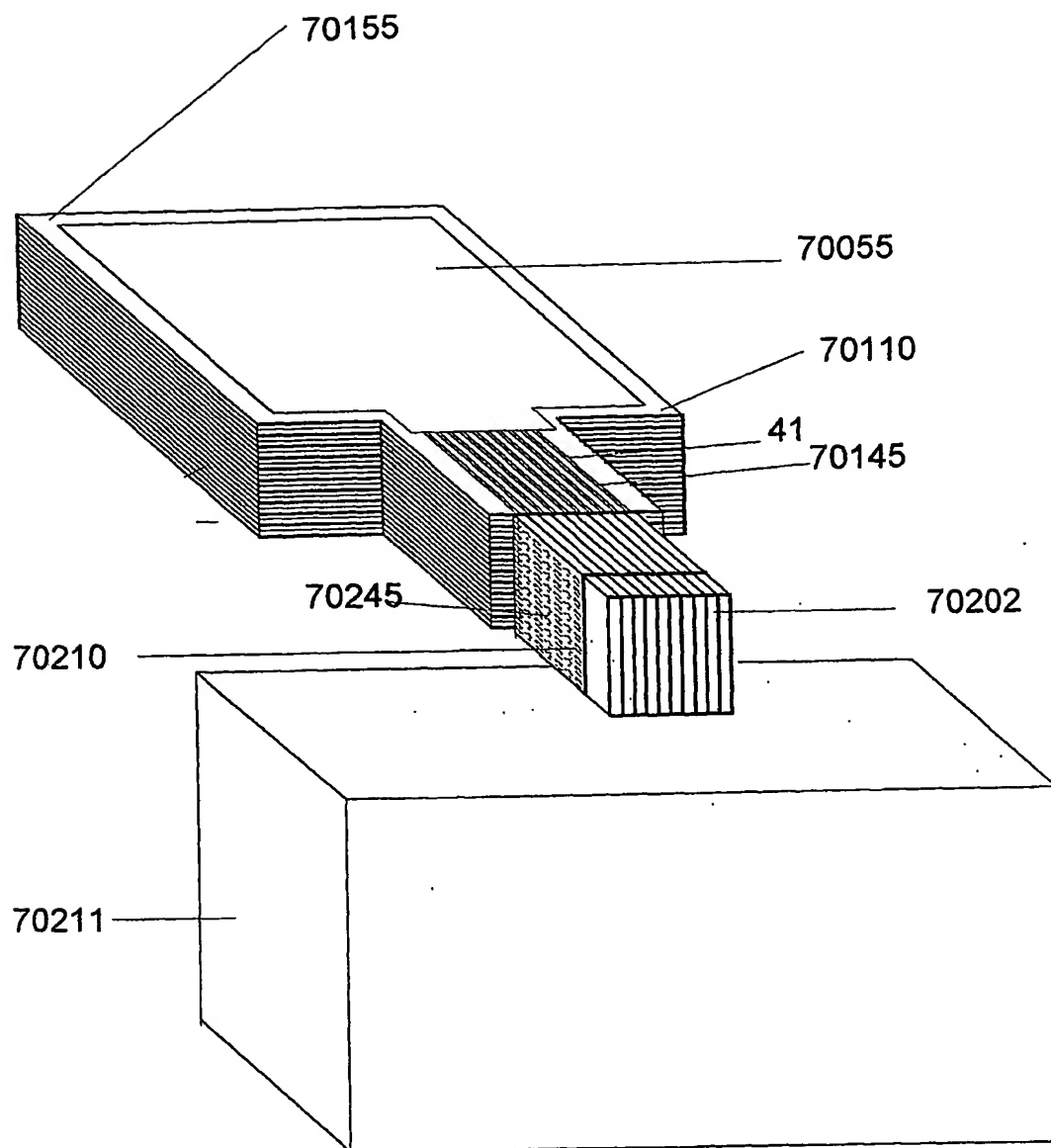


FIG. 32

21 / 42

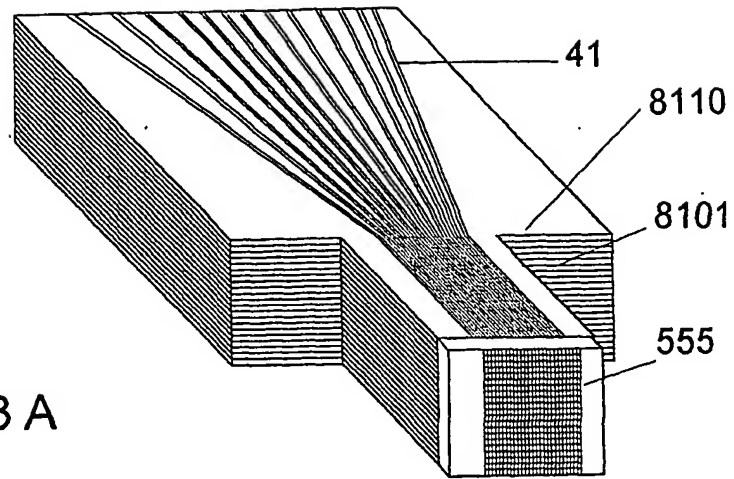


FIG. 33 A

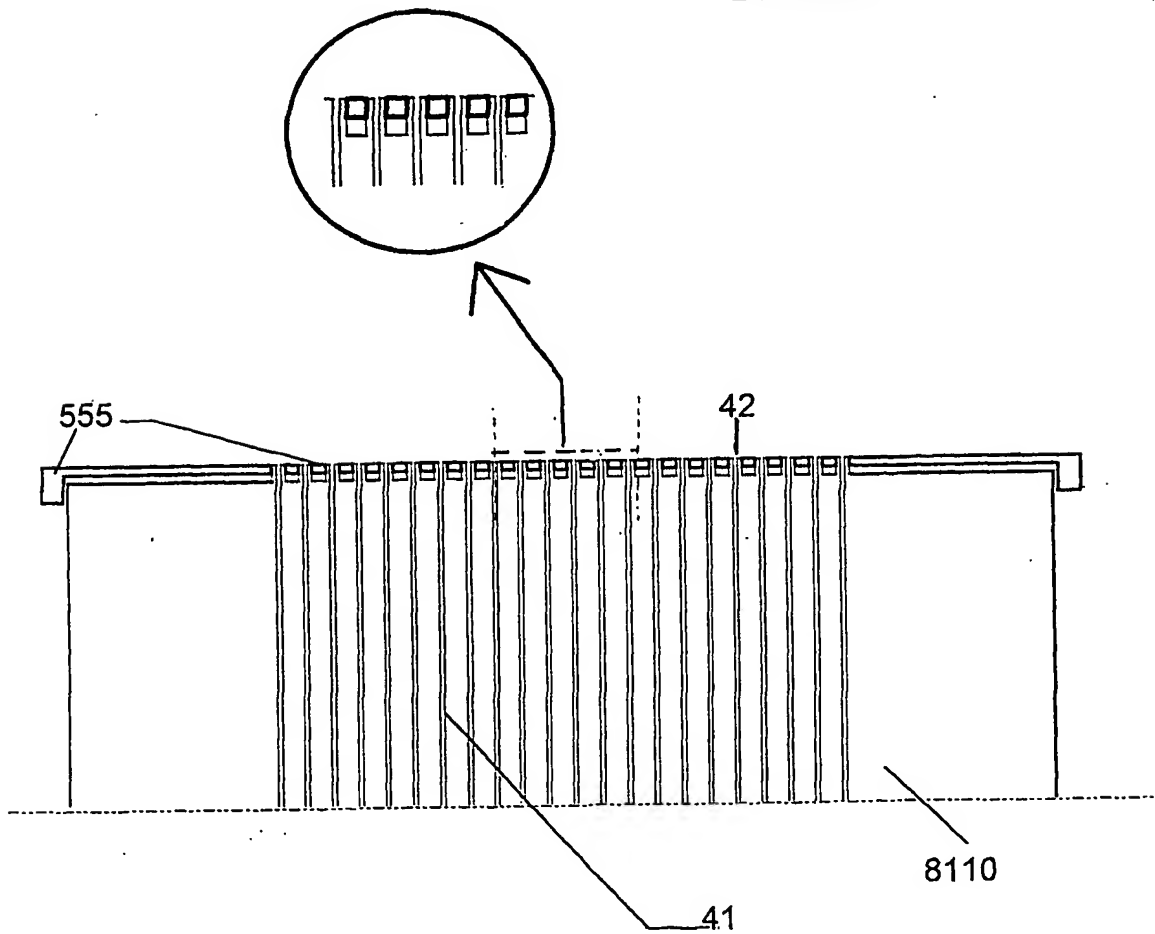


FIG. 33 B

22 / 42

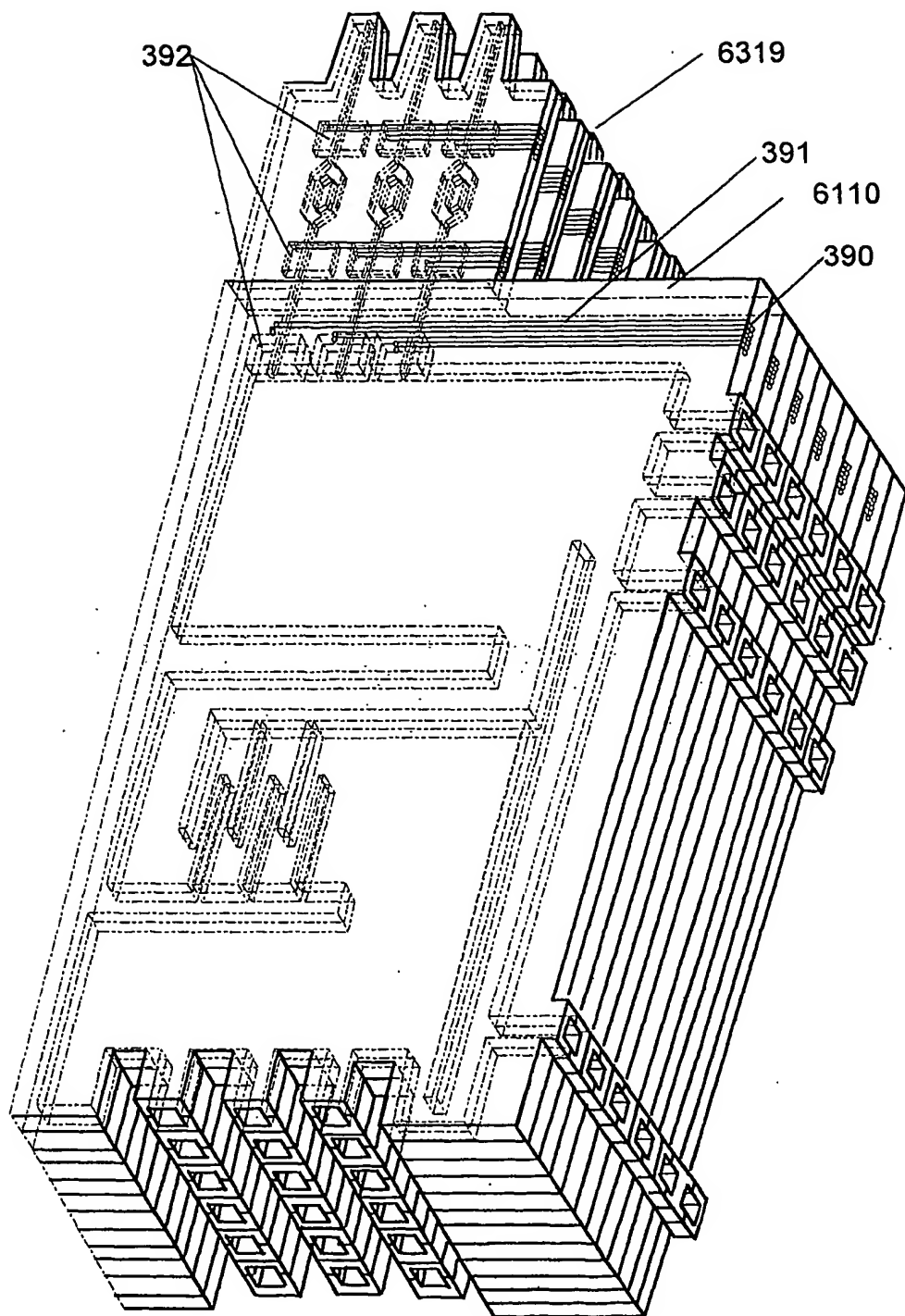


FIG. 34

23 / 42

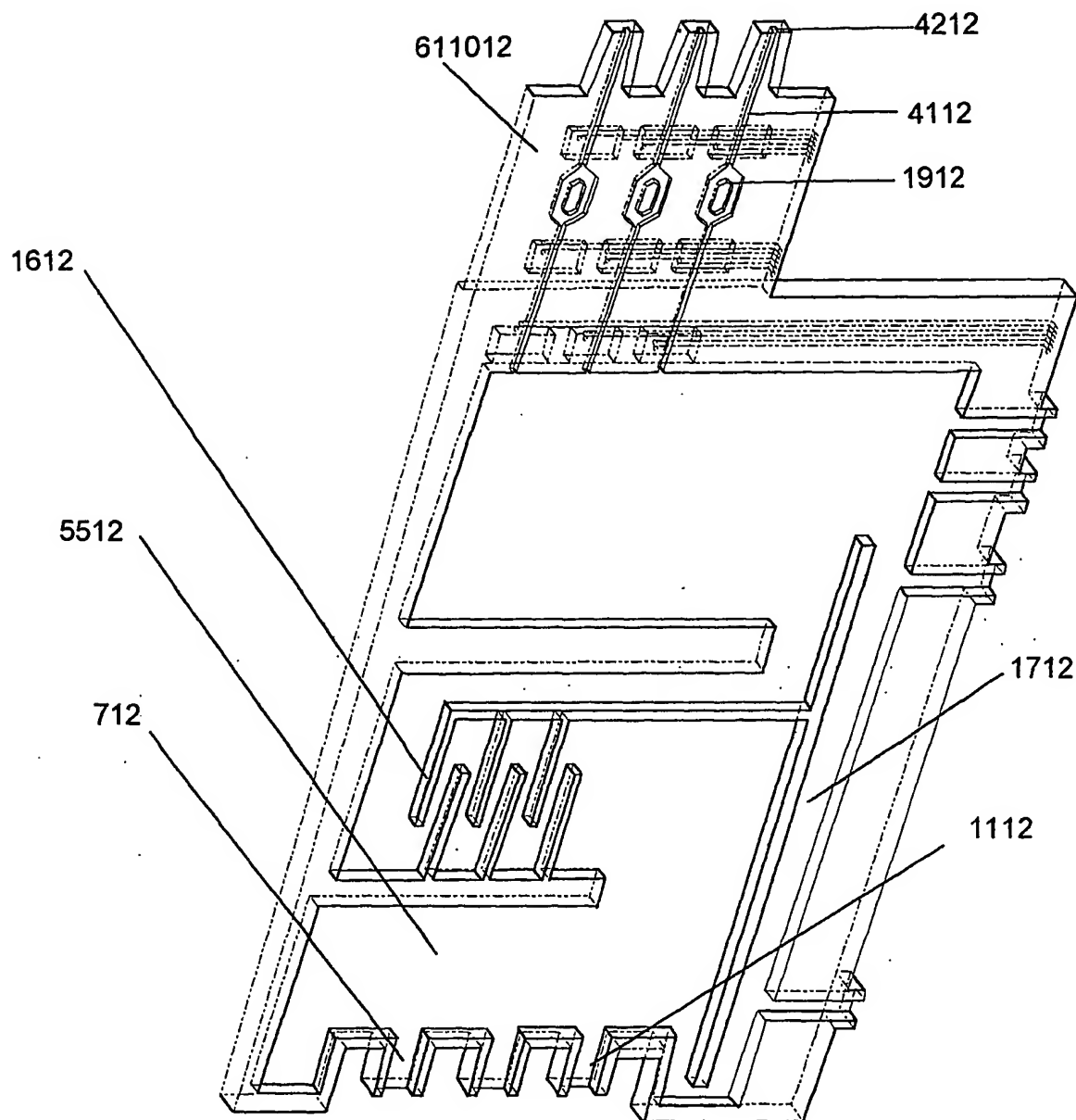


FIG. 35

24 / 42

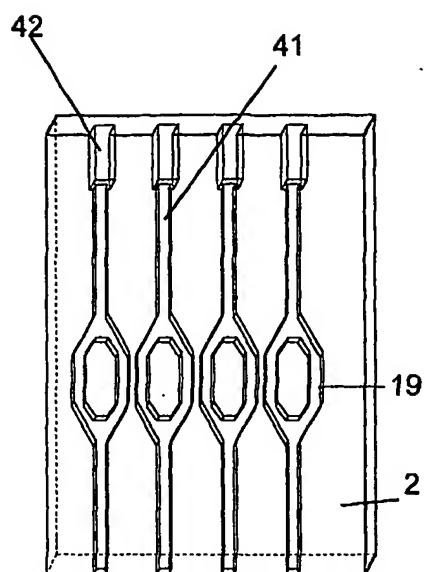


FIG. 36 A

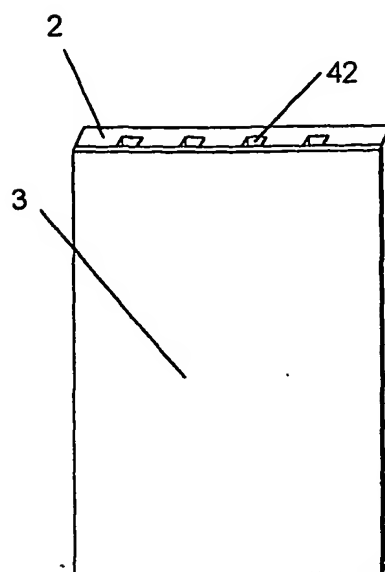


FIG. 36 B

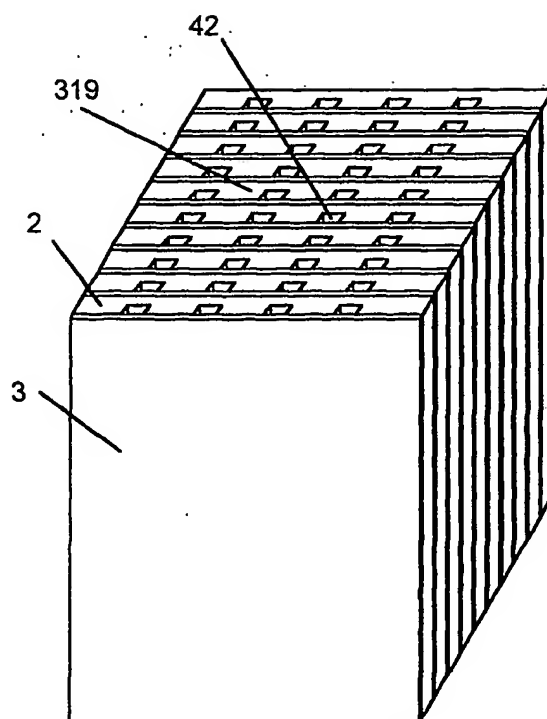


FIG. 36 C

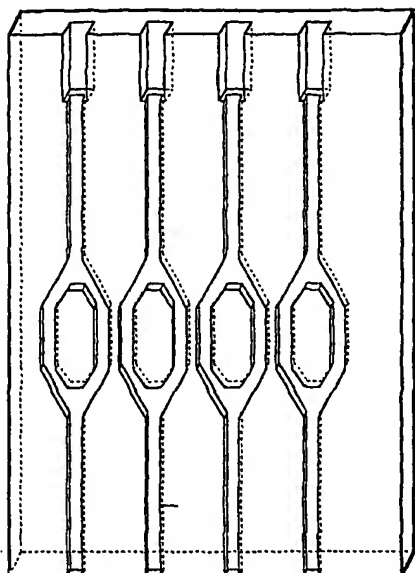


FIG. 37 A

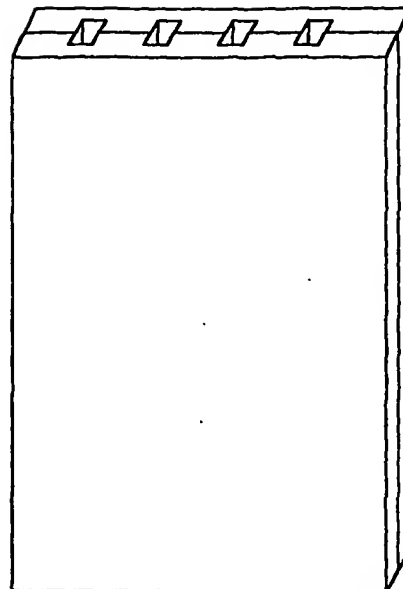


FIG. 37 B

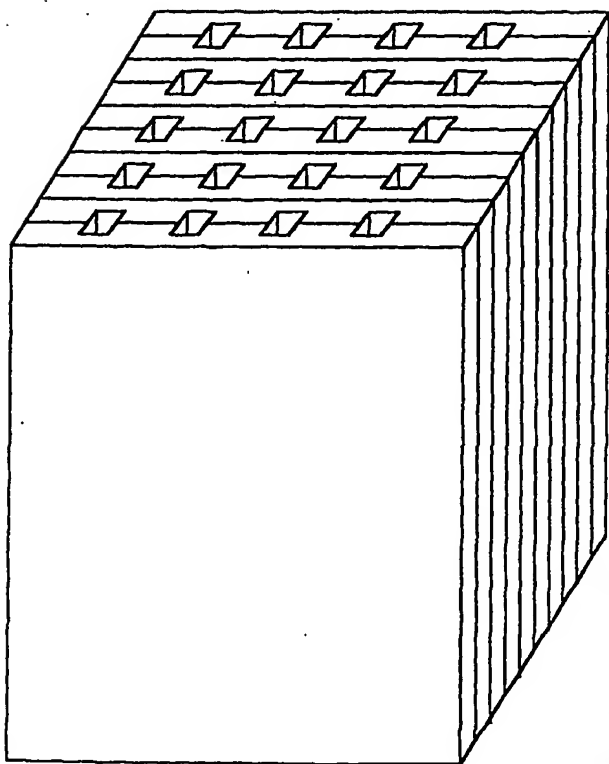


FIG. 37 C

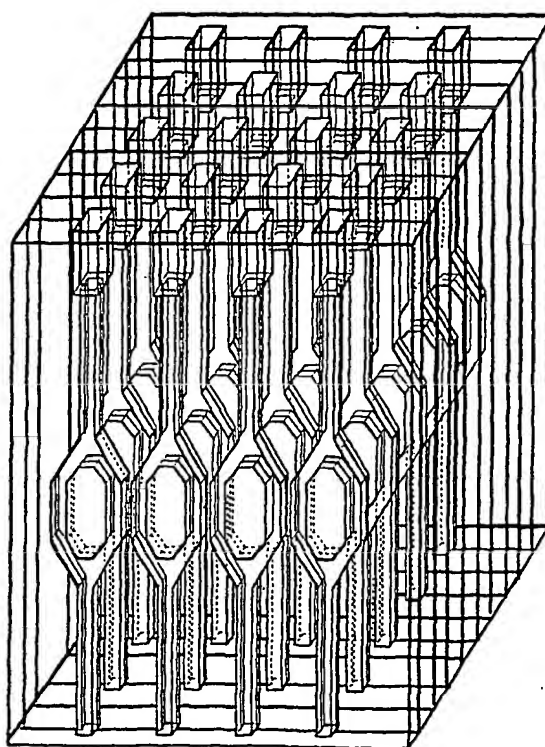


FIG. 37 D

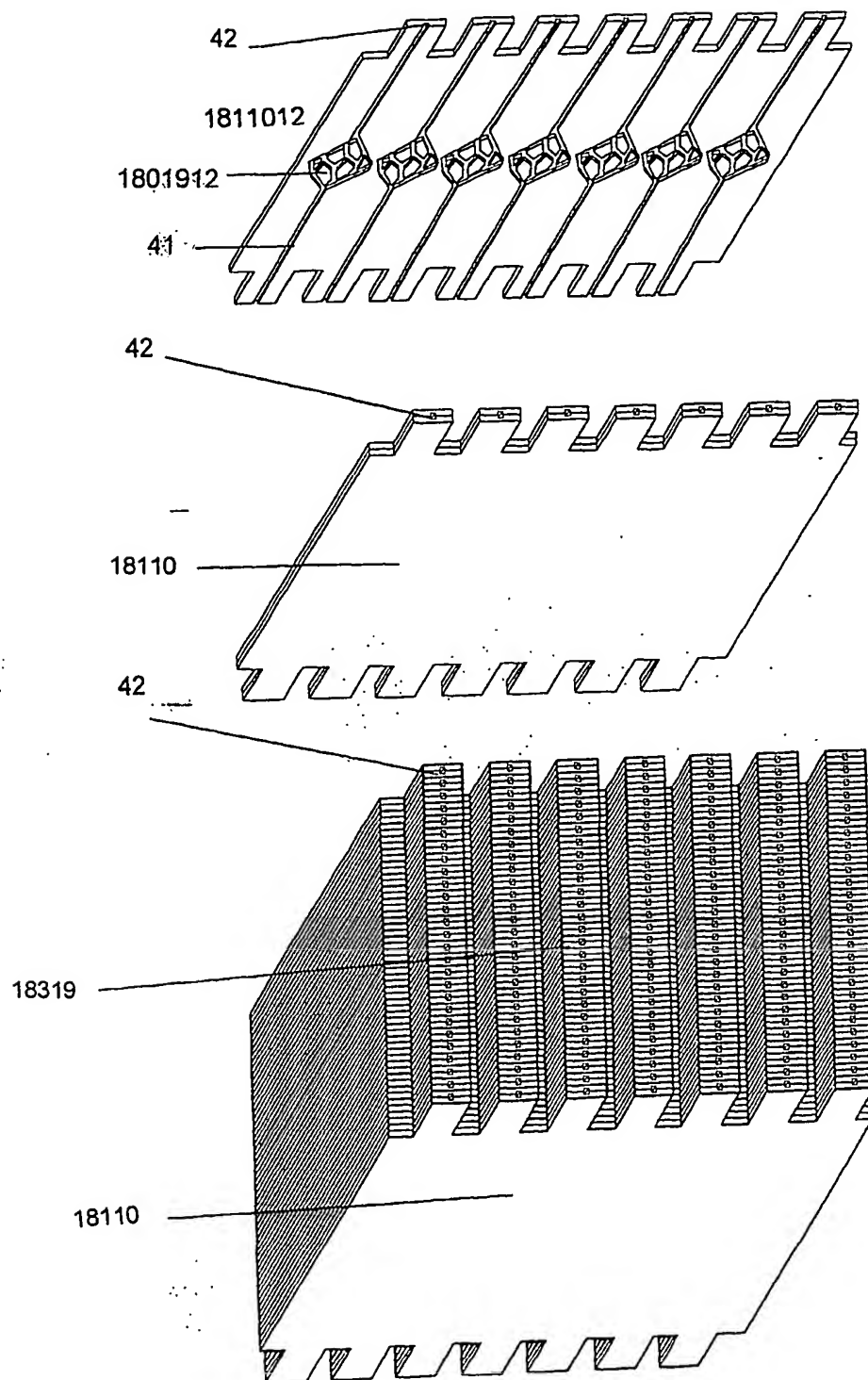


FIG. 38

27 / 42

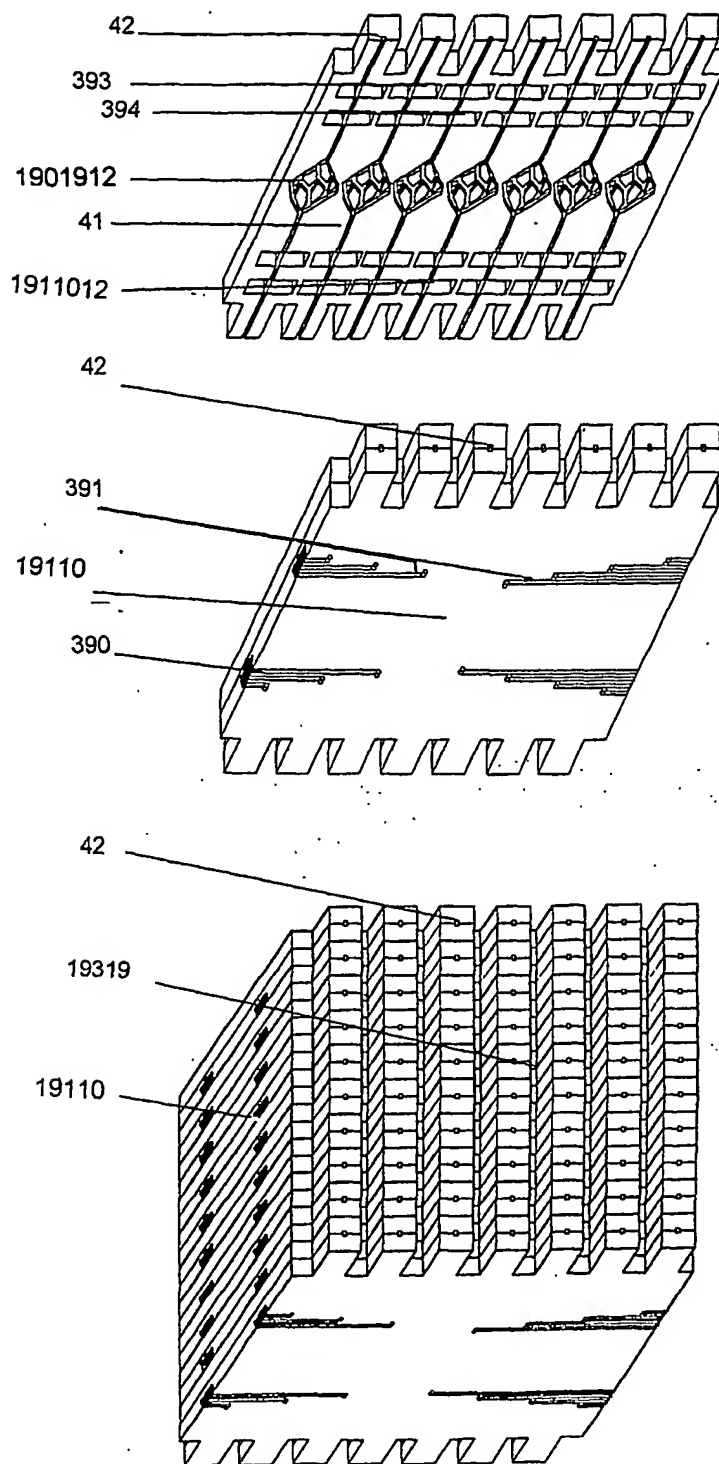


FIG. 39

28 / 42

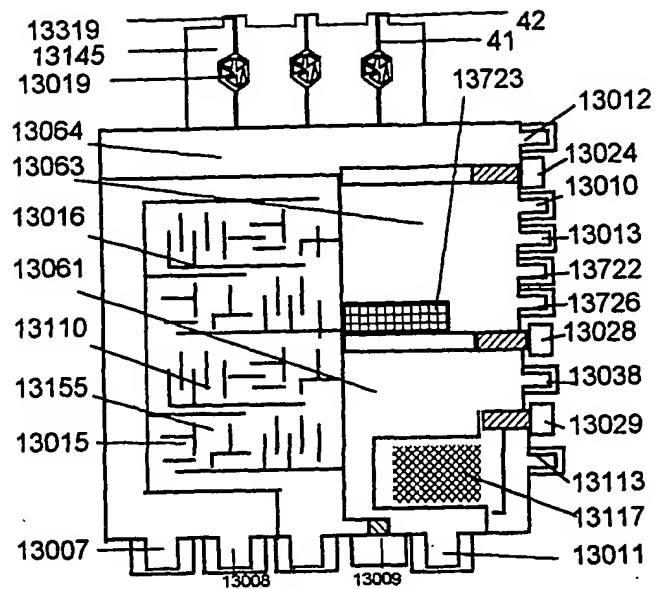


FIG 40 A

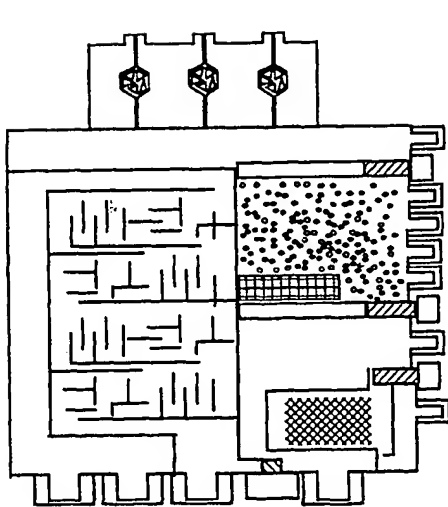


FIG. 40 B

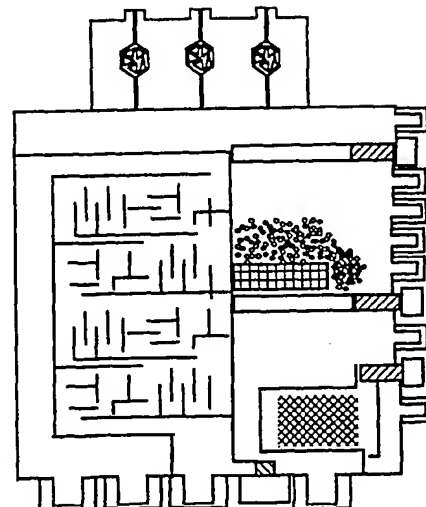


FIG. 40 C

29 / 42

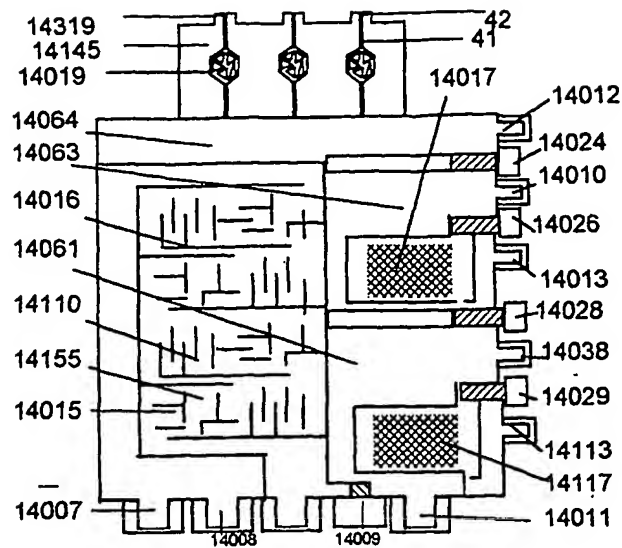


FIG 41 A

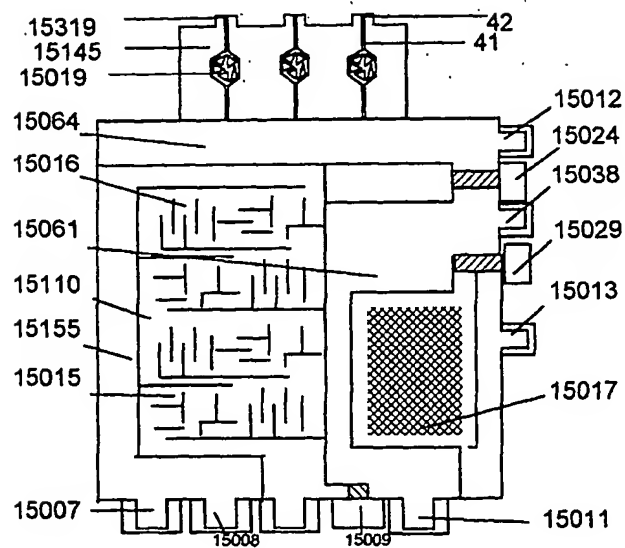


FIG. 41 B

30/42

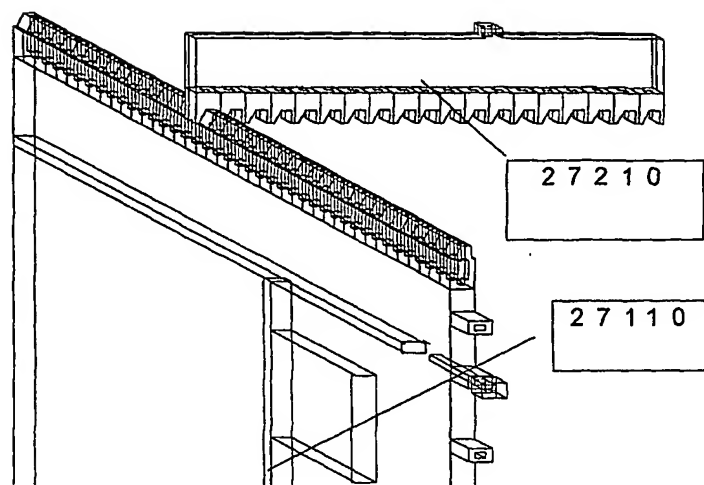


FIG 42

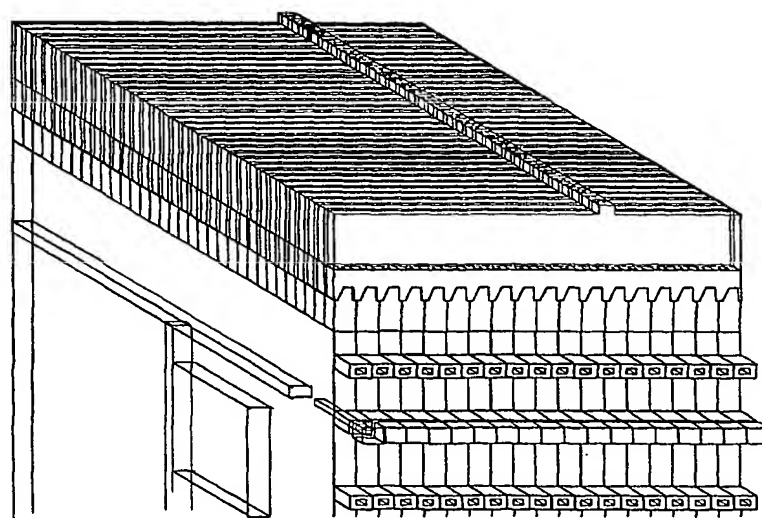


FIG. 43

31 / 42

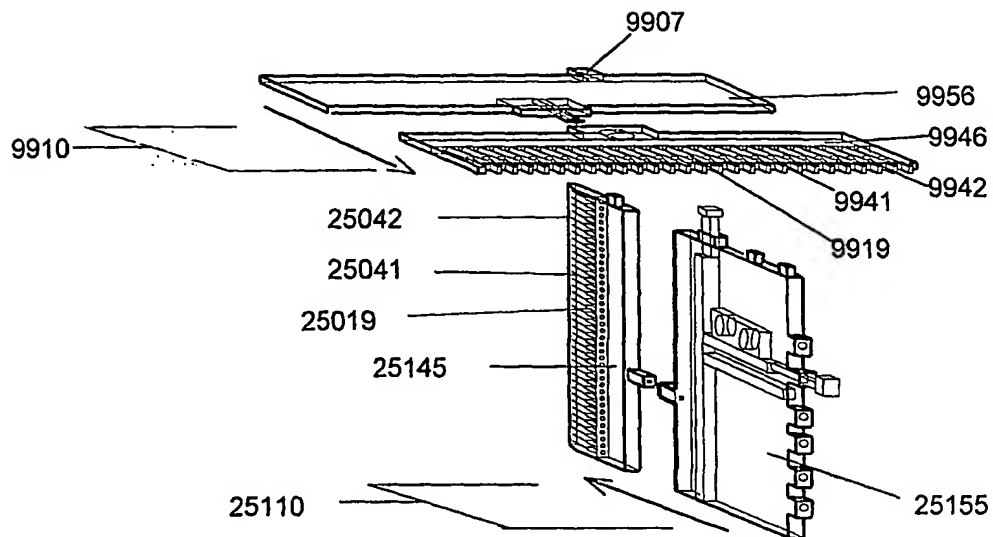


FIG. 44

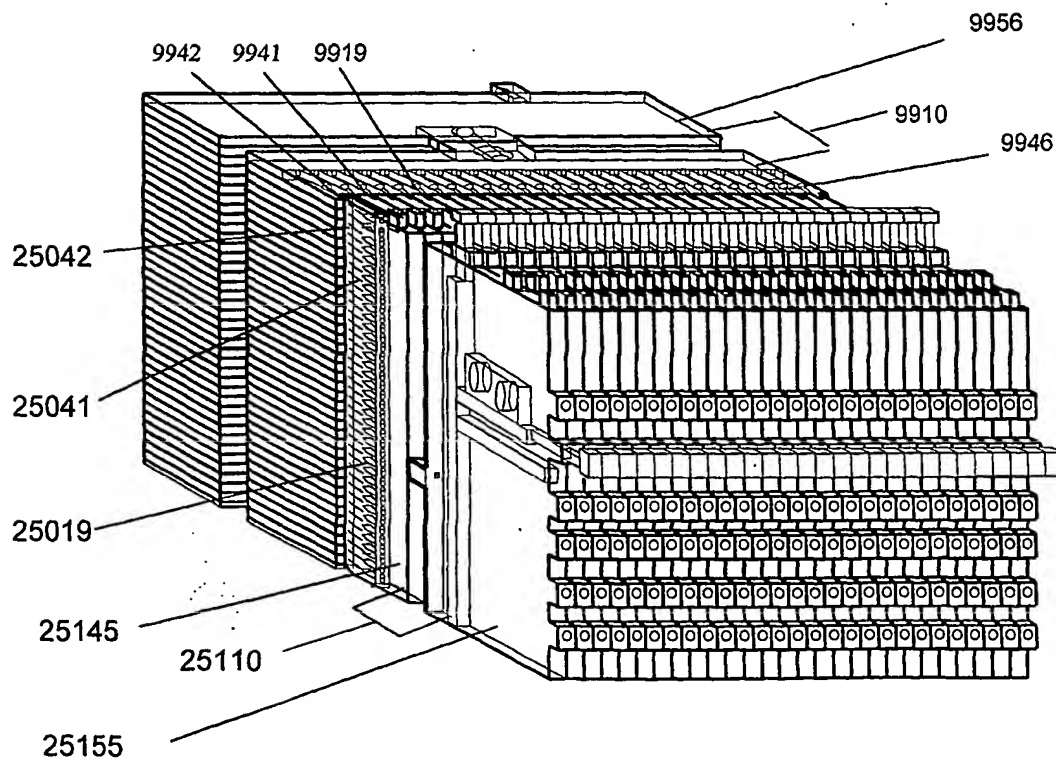
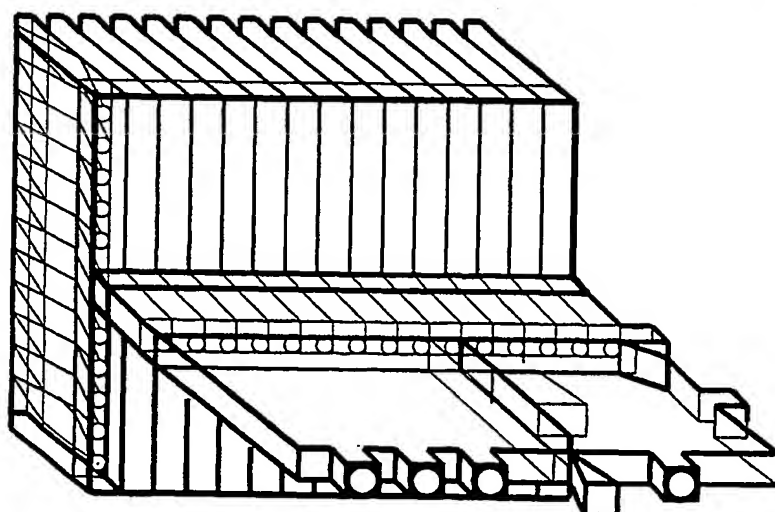
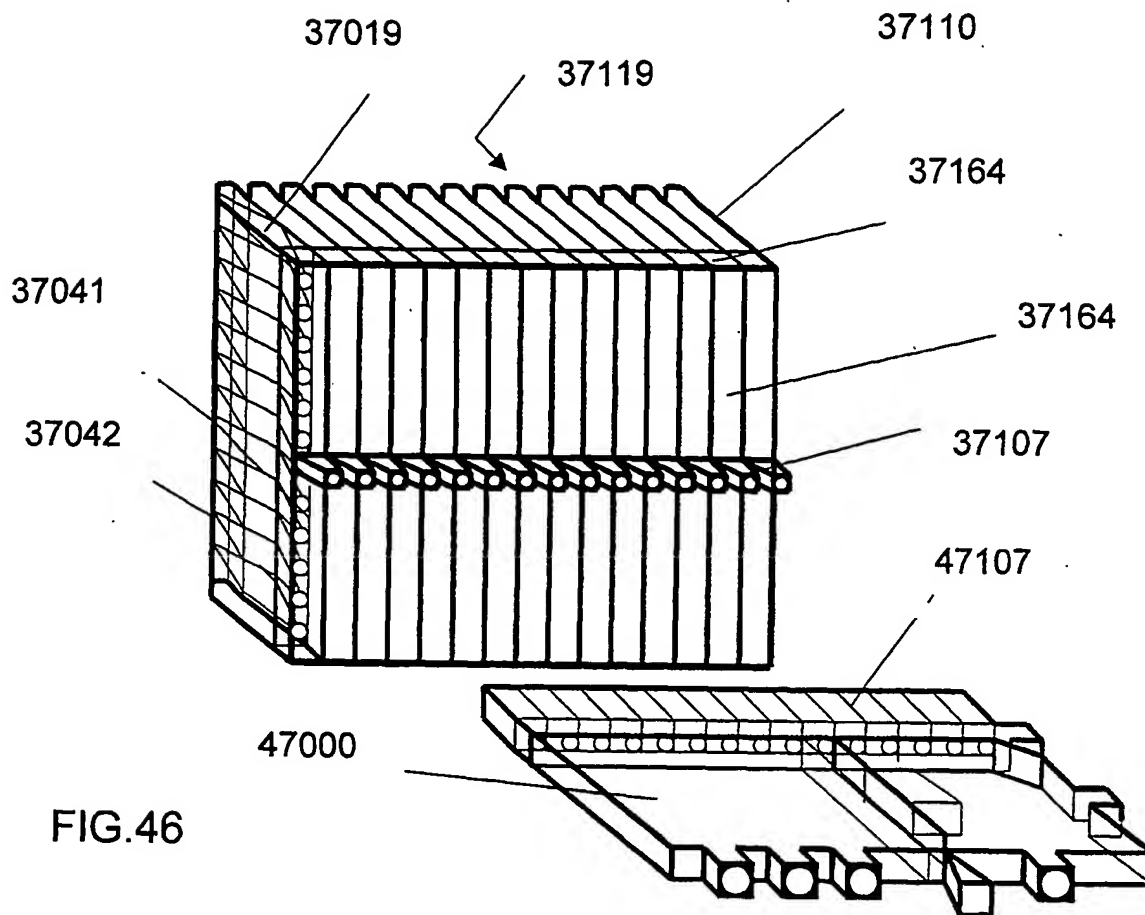


FIG. 45

32/42



33/42

FIG. 48

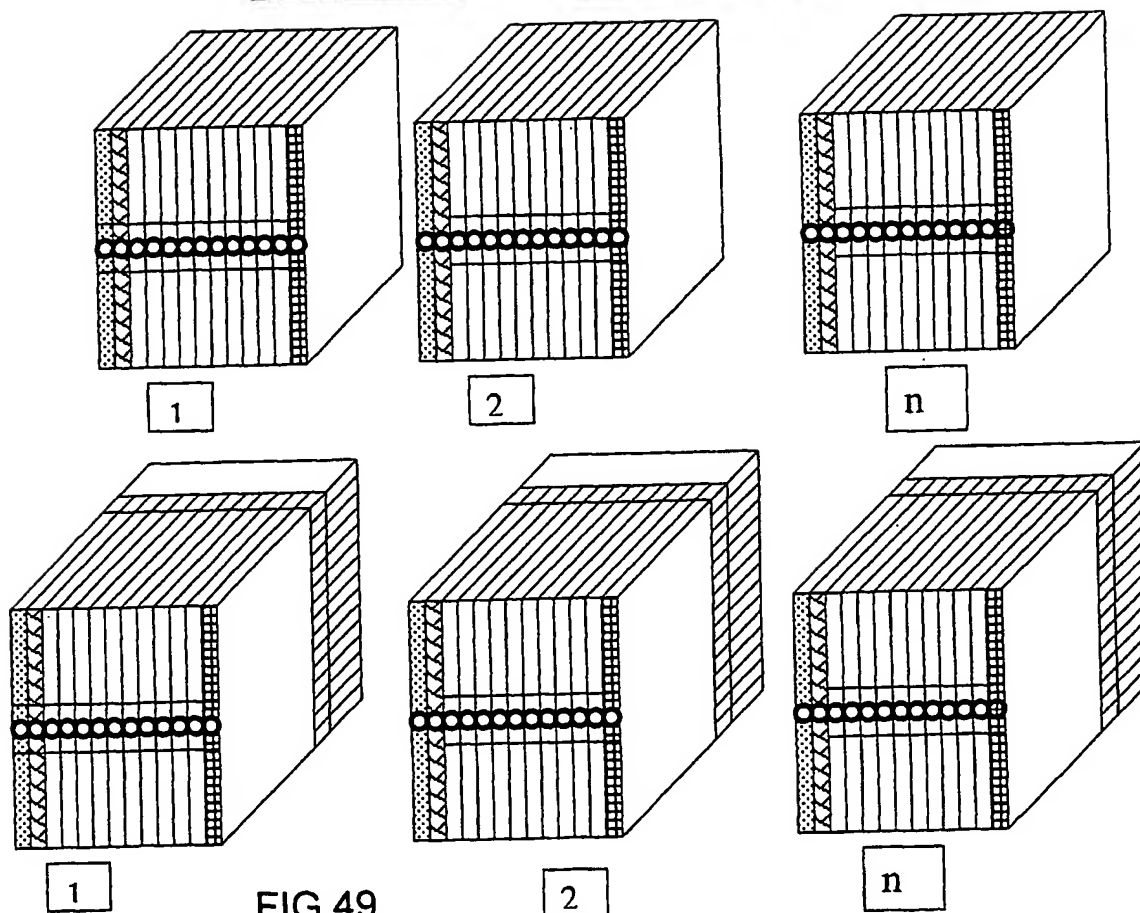
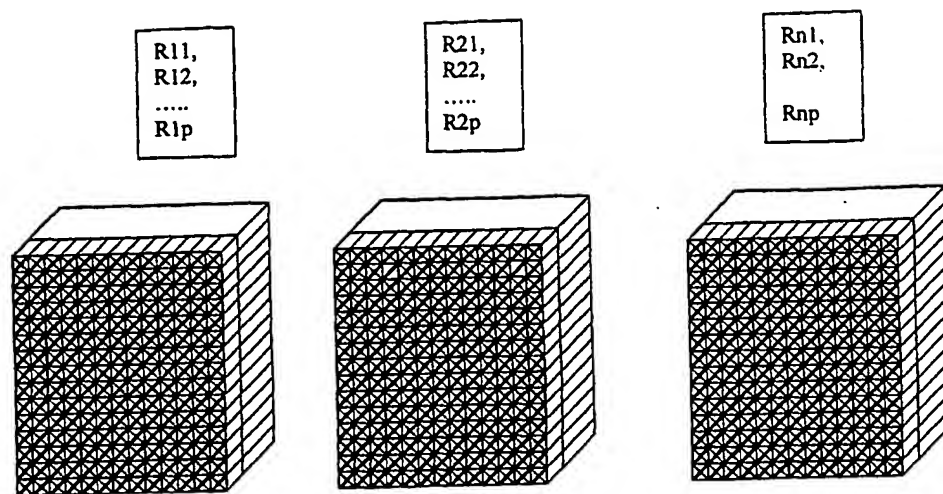


FIG.49

34/42

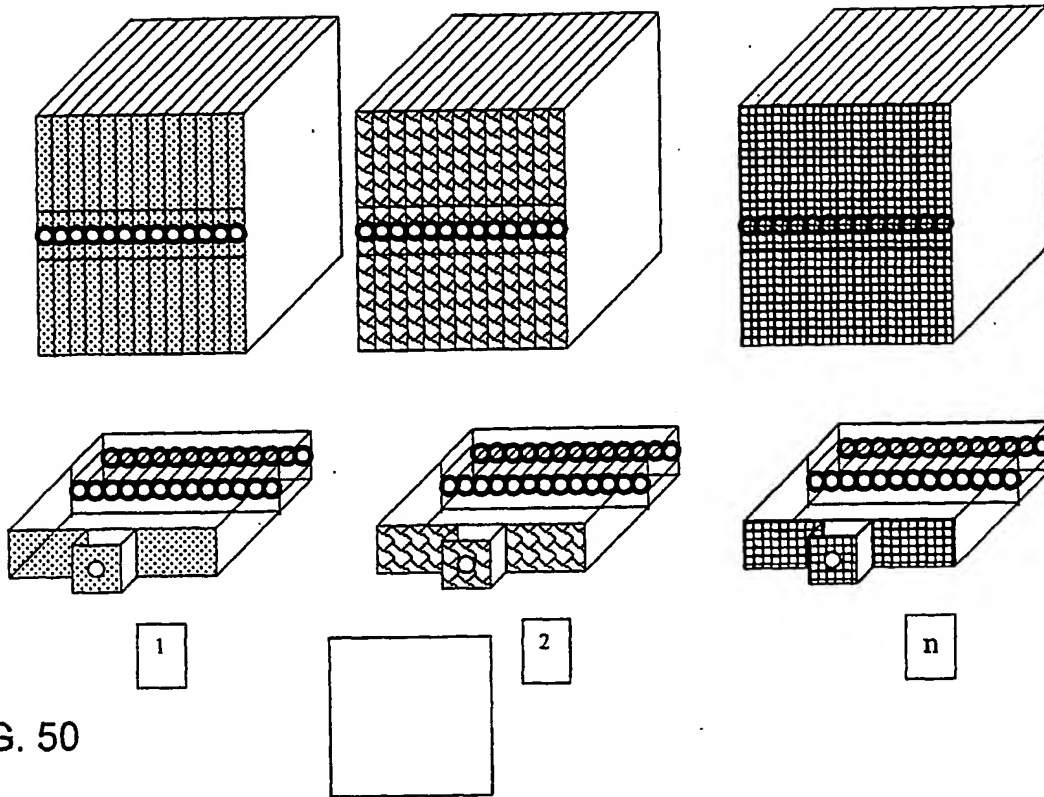


FIG. 50

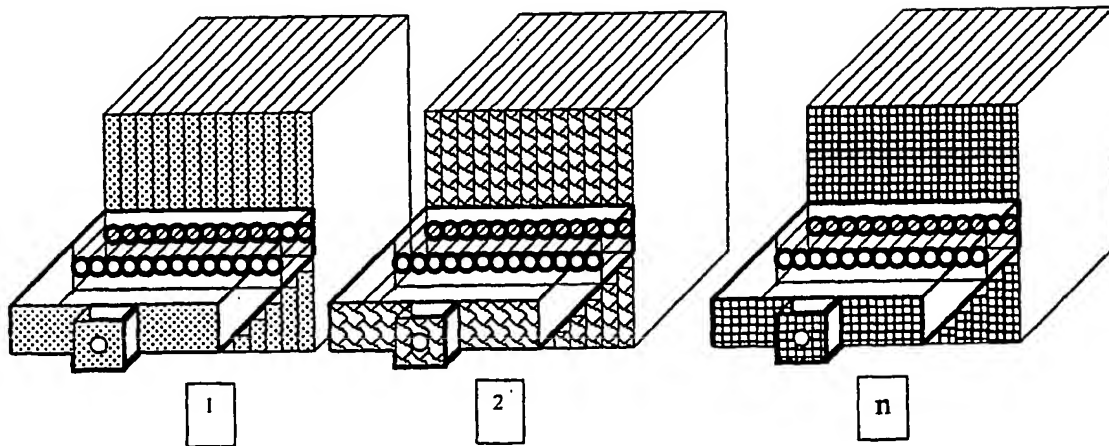


FIG. 51

35 / 42

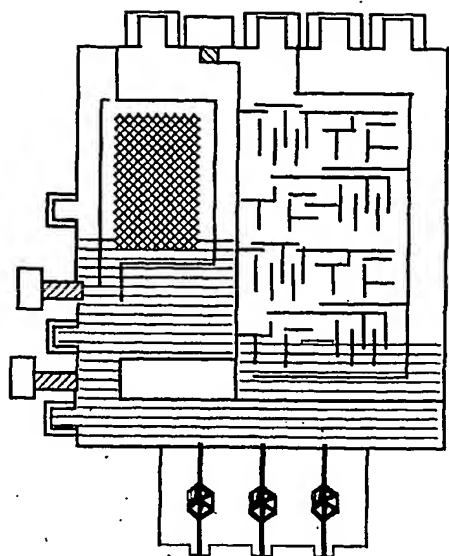


FIG. 52 A

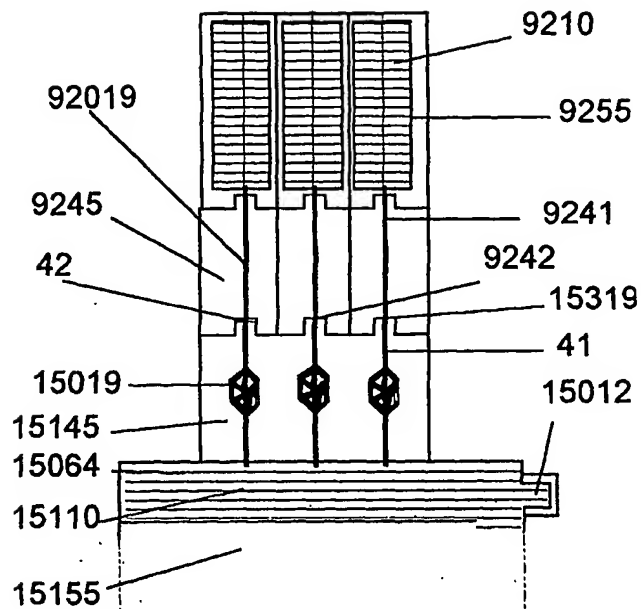


FIG. 52 B

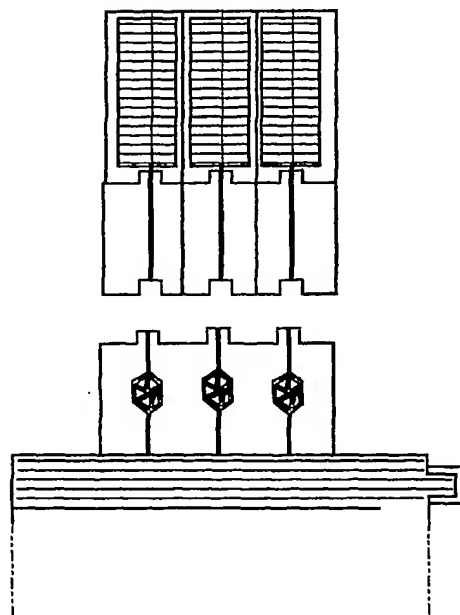


FIG. 52 C

36 / 42

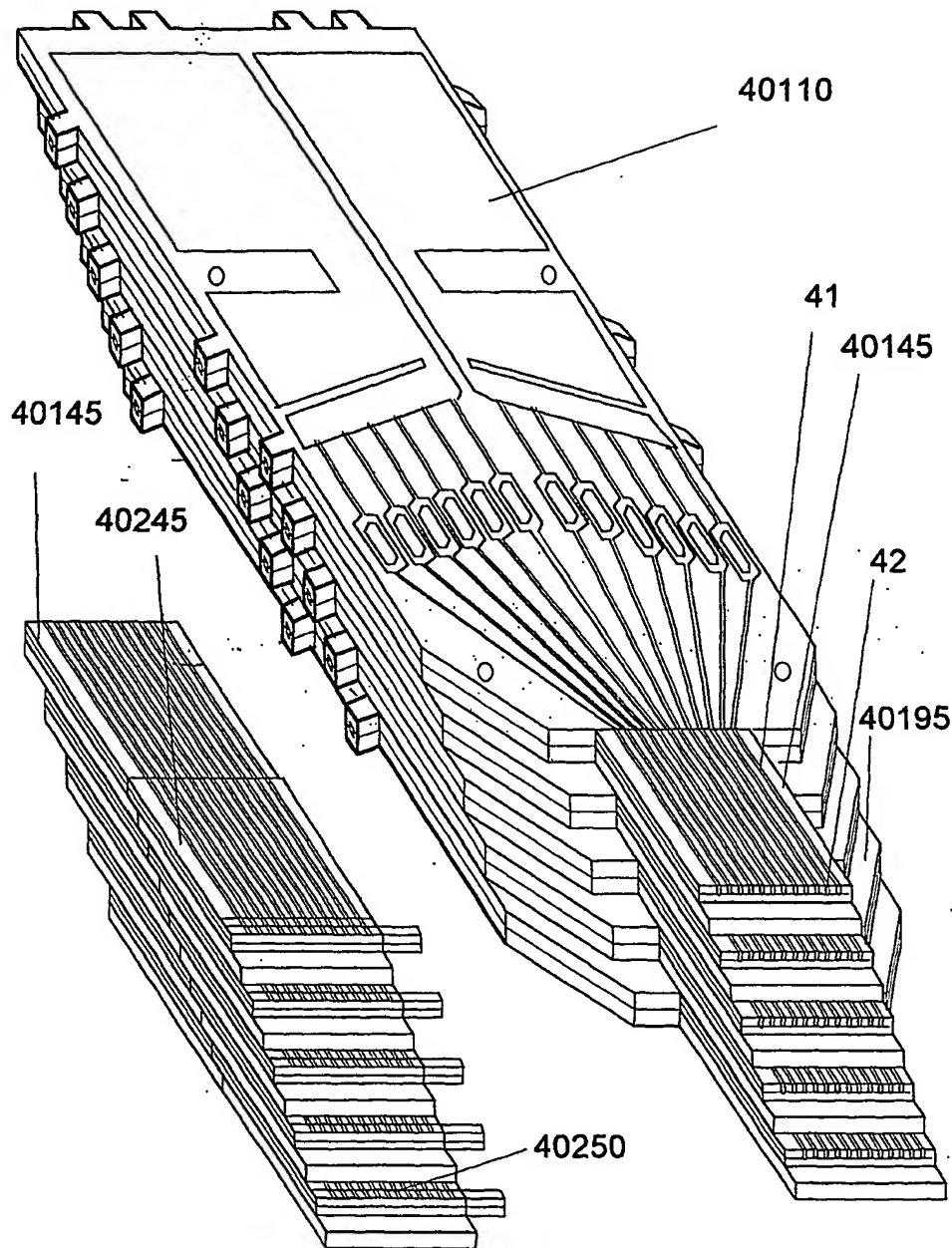


FIG. 53

37 / 42

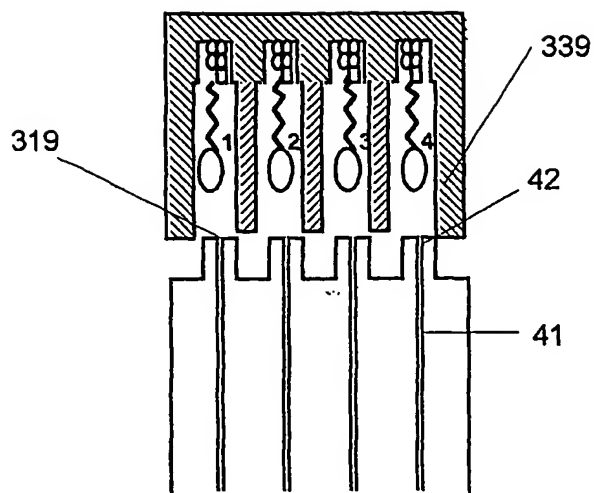


FIG. 54 A

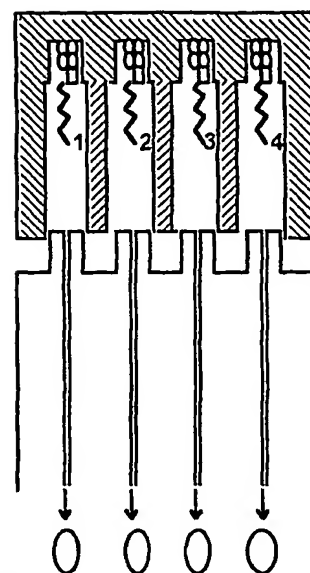


FIG. 54 B

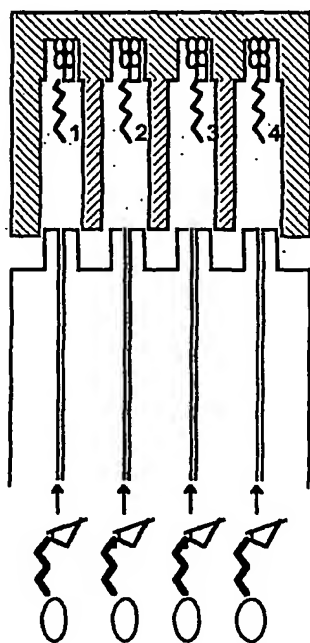


FIG. 54 C

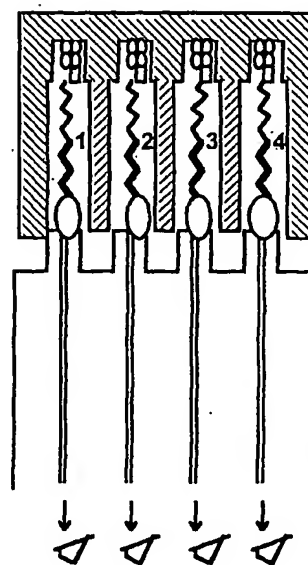


FIG. 54 D

support solide
microspheres, etc
 groupement protecteur

linker
 molécule d'activation

tetramer 1
1
 tetramer 2
2

tetramer 3
3
 tetramer 4
4

tetramer 5
5
 octamer

38 / 42

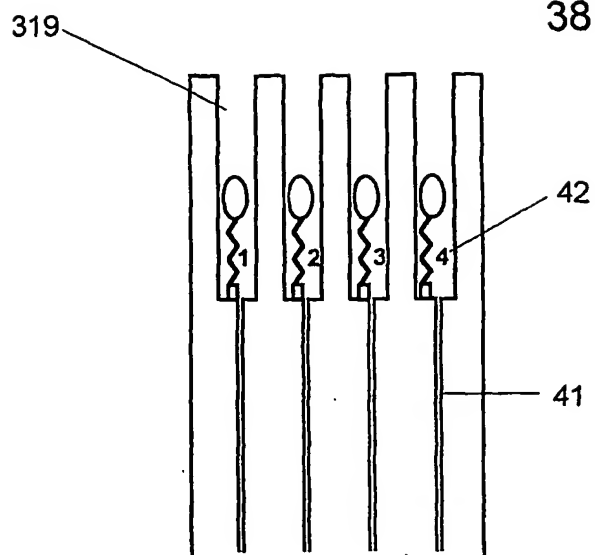


FIG. 55 A

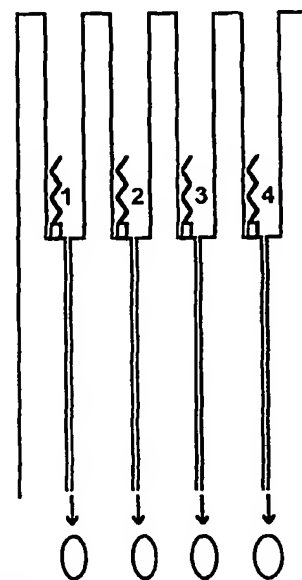


FIG. 55 B

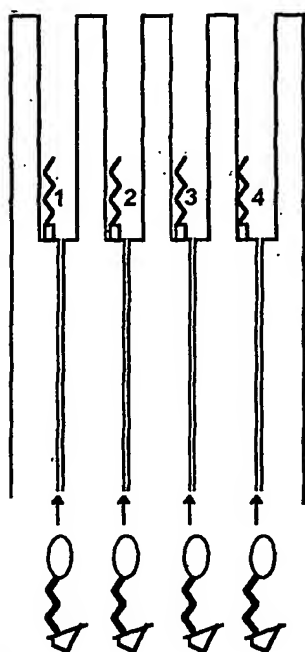


FIG. 55 C

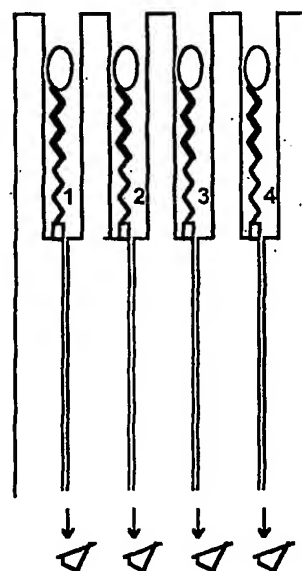






FIG. 55 D

 support solide
microspheres, etc
  groupement protecteur
 linker
 molécule d'activation

{ tetramer 1
1
 { tetramer 2
2
 { tetramer 3
3
 { tetramer 4
4
 { tetramer 5
5
 { octamer

39 / 42

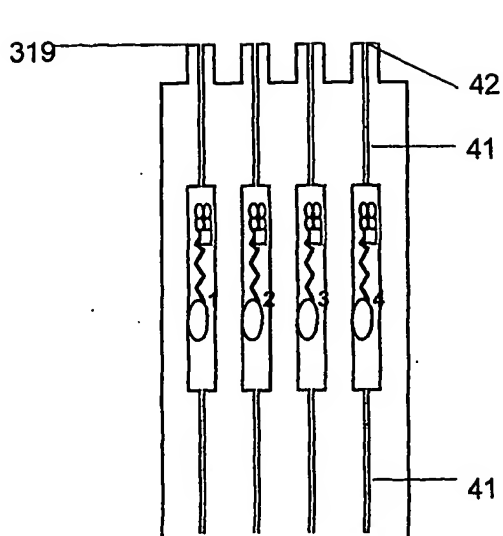


FIG. 56 A

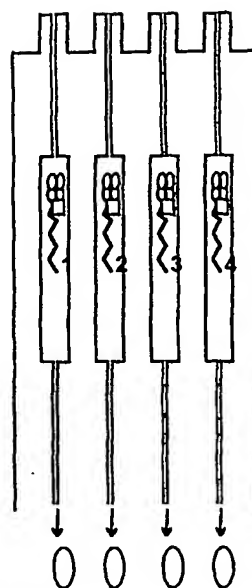


FIG. 56 B

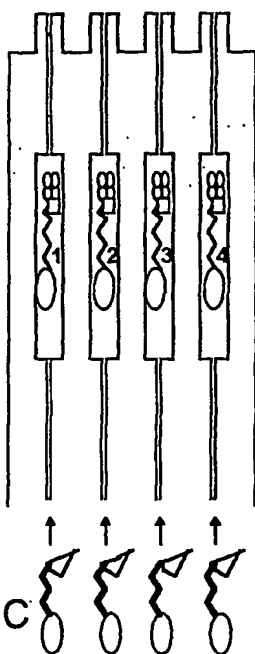


FIG. 56 C

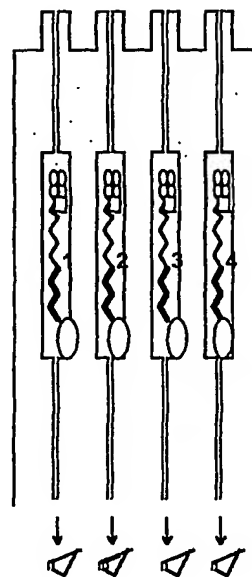






FIG. 56 D

 support solide
microspheres, etc
  linker
  groupement protecteur
  molécule d'activation

{ tetramer 1 { tetramer 2
 1 2
 { tetramer 3 { tetramer 4
 3 4
 { tetramer 5 { octamer
 5

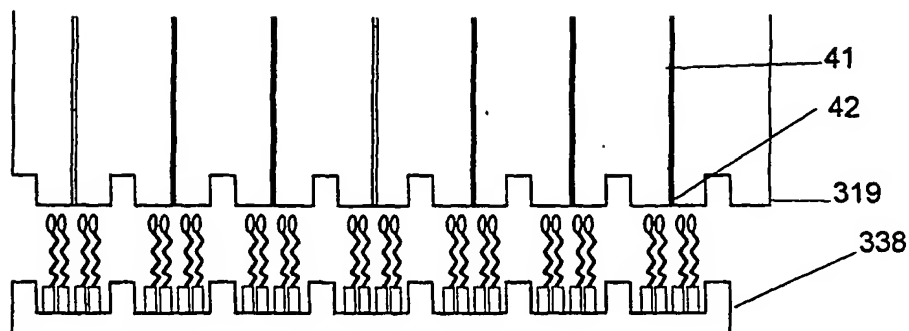


FIG. 57 A

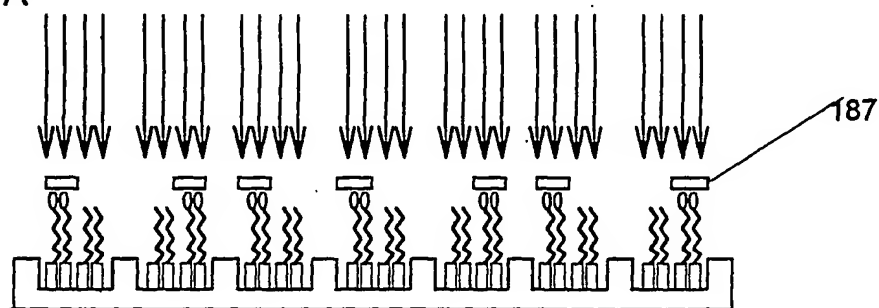


FIG. 57 B

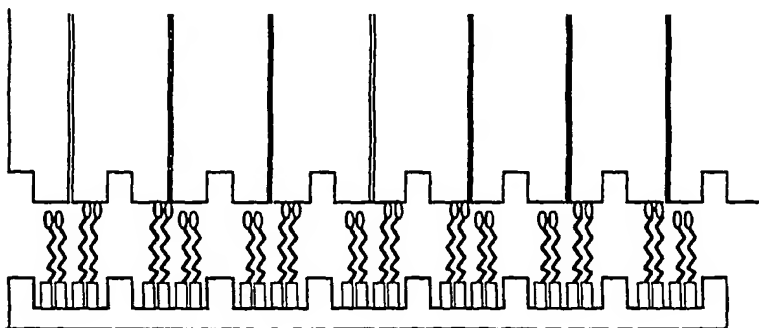
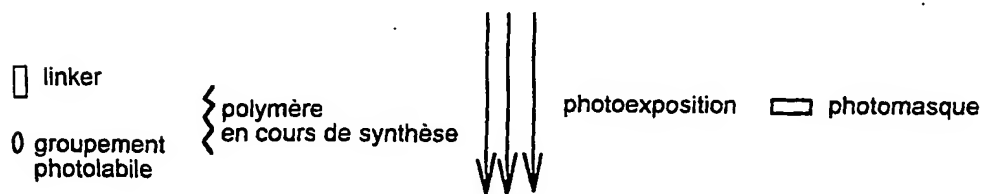


FIG. 57 C



41 / 42

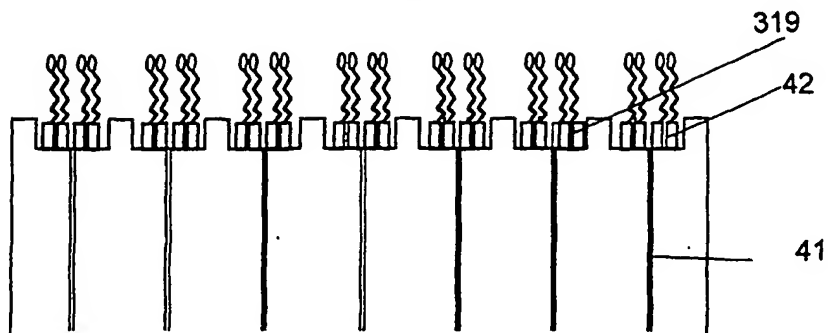


FIG. 58 A

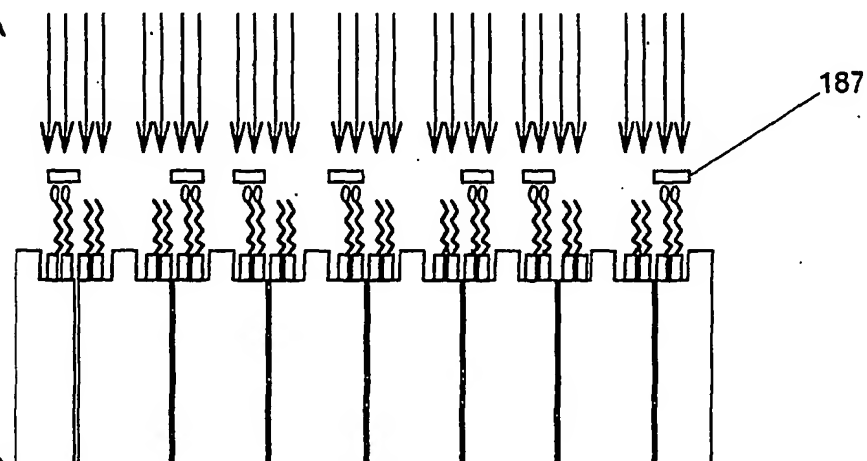


FIG. 58 B

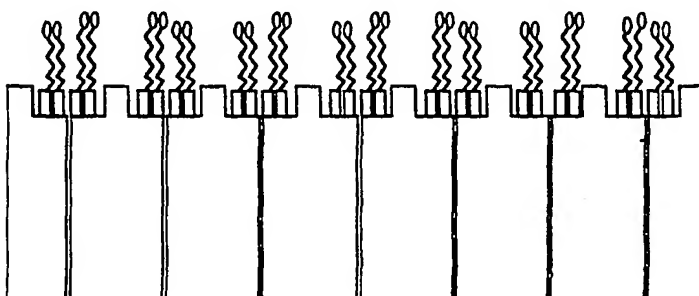
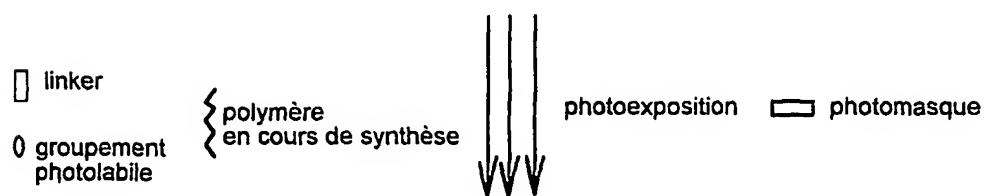


FIG. 58 C



42 / 42

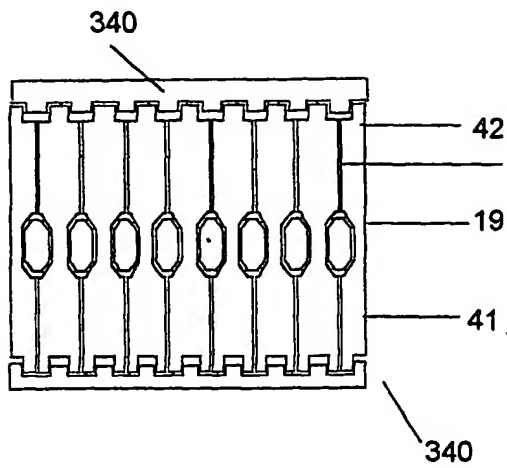


FIG. 59 A

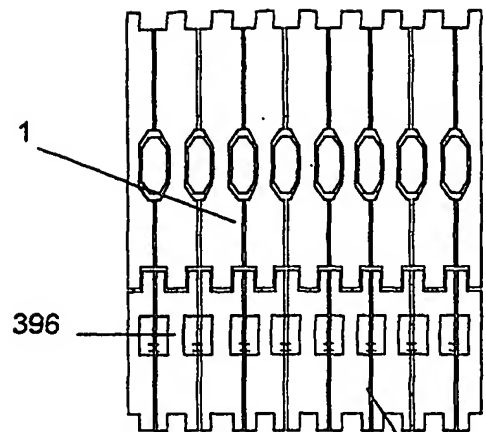


FIG. 59 B

1101

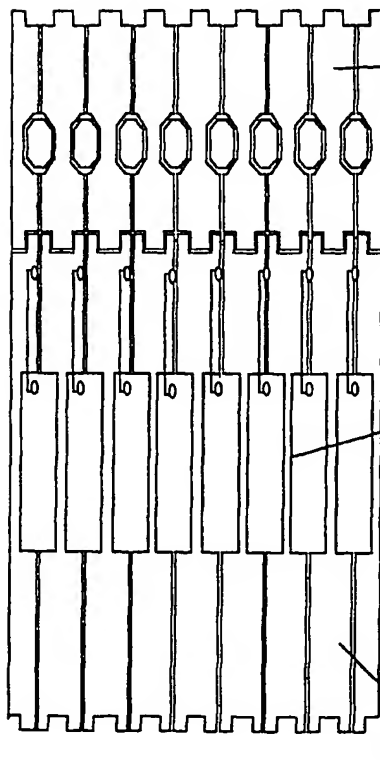


FIG. 59 C

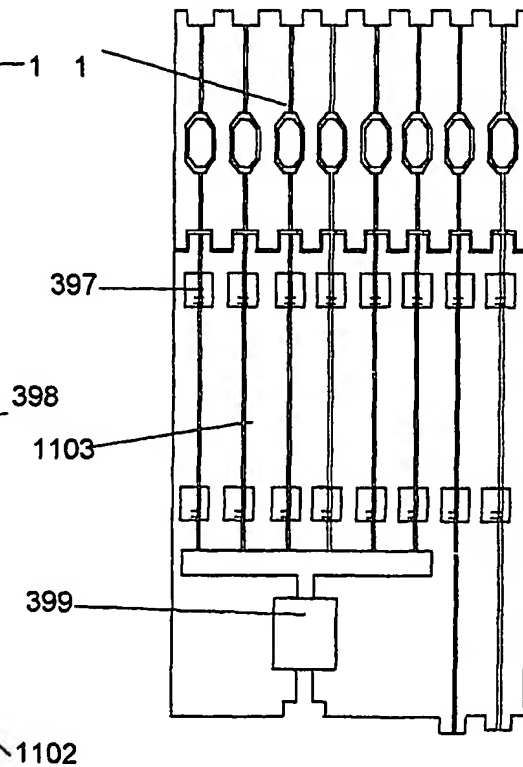


FIG. 59 D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 01/00881

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 B01L3/00 //B01J19/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 B01L B01J G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 3 915 652 A (NATELSON SAMUEL) 28 October 1975 (1975-10-28) column 1, line 9 -column 1, line 33 column 3, line 49 -column 3, line 59 column 3, line 49 -column 3, line 59 column 4, line 32 -column 4, line 41 column 5, line 49 -column 6, line 27	1,6,17, 20,21,27
A	column 7, line 41 -column 11, line 45 figures 10-12 abstract <div style="text-align: center;"> --- -/-- </div>	1
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 July 2001		Date of mailing of the international search report 11/07/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Koch, A

Internal Application No
PCT/FR 01/00881

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/00881

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 3915652 A	28-10-1975	US 3859051 A	07-01-1975
EP 0840886 A	13-05-1998	CA 2227331 A	06-02-1997
		WO 9704297 A	06-02-1997
		US 5872010 A	16-02-1999
EP 0955084 A	10-11-1999	AU 3552499 A	16-11-1999
		AU 3760499 A	16-11-1999
		EP 1075327 A	14-02-2001
		WO 9955460 A	04-11-1999
		WO 9955461 A	04-11-1999
US 5508200 A	16-04-1996	NONE	

Demande Internationale No
PCT/FR 01/00881

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 3 915 652 A (NATELSON SAMUEL)	1,6,17,
	28 octobre 1975 (1975-10-28)	20,21,27
	colonne 1, ligne 9 -colonne 1, ligne 33	
	colonne 3, ligne 49 -colonne 3, ligne 59	
	colonne 3, ligne 49 -colonne 3, ligne 59	
	colonne 4, ligne 32 -colonne 4, ligne 41	
	colonne 5, ligne 49 -colonne 6, ligne 27	
A	colonne 7, ligne 41 -colonne 11, ligne 45	1
	figures 10-12	
	abrégé	

	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

^T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention.

¹⁰ "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément.

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

'&' document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 juillet 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11/07/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Koch, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 01/00881

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 840 886 A (UNIV NORTHEASTERN) 13 mai 1998 (1998-05-13)	1, 2, 4, 9, 13, 16, 19, 20, 26
A	-& US 5 872 010 A (DUNAYEVSKY YURIY M ET AL) 16 février 1999 (1999-02-16) colonne 1, ligne 64 -colonne 2, ligne 9 colonne 4, ligne 12 -colonne 4, ligne 34 colonne 5, ligne 65 -colonne 6, ligne 67 colonne 7, ligne 14 -colonne 8, ligne 16 colonne 8, ligne 41 -colonne 9, ligne 18 colonne 11, ligne 25 -colonne 11, ligne 45 figures 1-6	6
A	EP 0 955 084 A (CORNING INC) 10 novembre 1999 (1999-11-10)	1, 2, 10, 17, 18, 20-22, 25
A	colonne 2, ligne 5 -colonne 2, ligne 9 colonne 4, ligne 40 -colonne 5, ligne 48 colonne 8, ligne 43 -colonne 9, ligne 44 colonne 11, ligne 7 -colonne 11, ligne 20 colonne 8, ligne 21 -colonne 20, ligne 28 figures 1-21	28, 29
A	US 5 508 200 A (THAYER PHILLIP ET AL) 16 avril 1996 (1996-04-16)	1, 4, 9, 11, 23
A	colonne 2, ligne 35 -colonne 2, ligne 44 colonne 4, ligne 21 -colonne 4, ligne 35 colonne 7, ligne 43 -colonne 7, ligne 53 colonne 8, ligne 22 -colonne 8, ligne 34 colonne 8, ligne 44 -colonne 9, ligne 33 figures 10-13	11

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 01/00881

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 3915652 A	28-10-1975	US 3859051 A	07-01-1975
EP 0840886 A	13-05-1998	CA 2227331 A	06-02-1997
		WO 9704297 A	06-02-1997
		US 5872010 A	16-02-1999
EP 0955084 A	10-11-1999	AU 3552499 A	16-11-1999
		AU 3760499 A	16-11-1999
		EP 1075327 A	14-02-2001
		WO 9955460 A	04-11-1999
		WO 9955461 A	04-11-1999
US 5508200 A	16-04-1996	AUCUN	